

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 11-071288

(43)Date of publication of application : 16.03.1999

(51)Int.Cl.

A61K 35/12

A61K 39/395

C12N 15/09

(21)Application number : 10-170389 (71)Applicant : GSF

FORSCHUNGSZENTRUM
FUER UMWELT &
GESUNDHEIT GMBH

(22)Date of filing :

17.06.1998 (72)Inventor : LINDHOFER HORST DR
KOLB HANS-JOCHEM
ZEIDLER REINHARD DR
BORNKAMM GEORG

(30)Priority

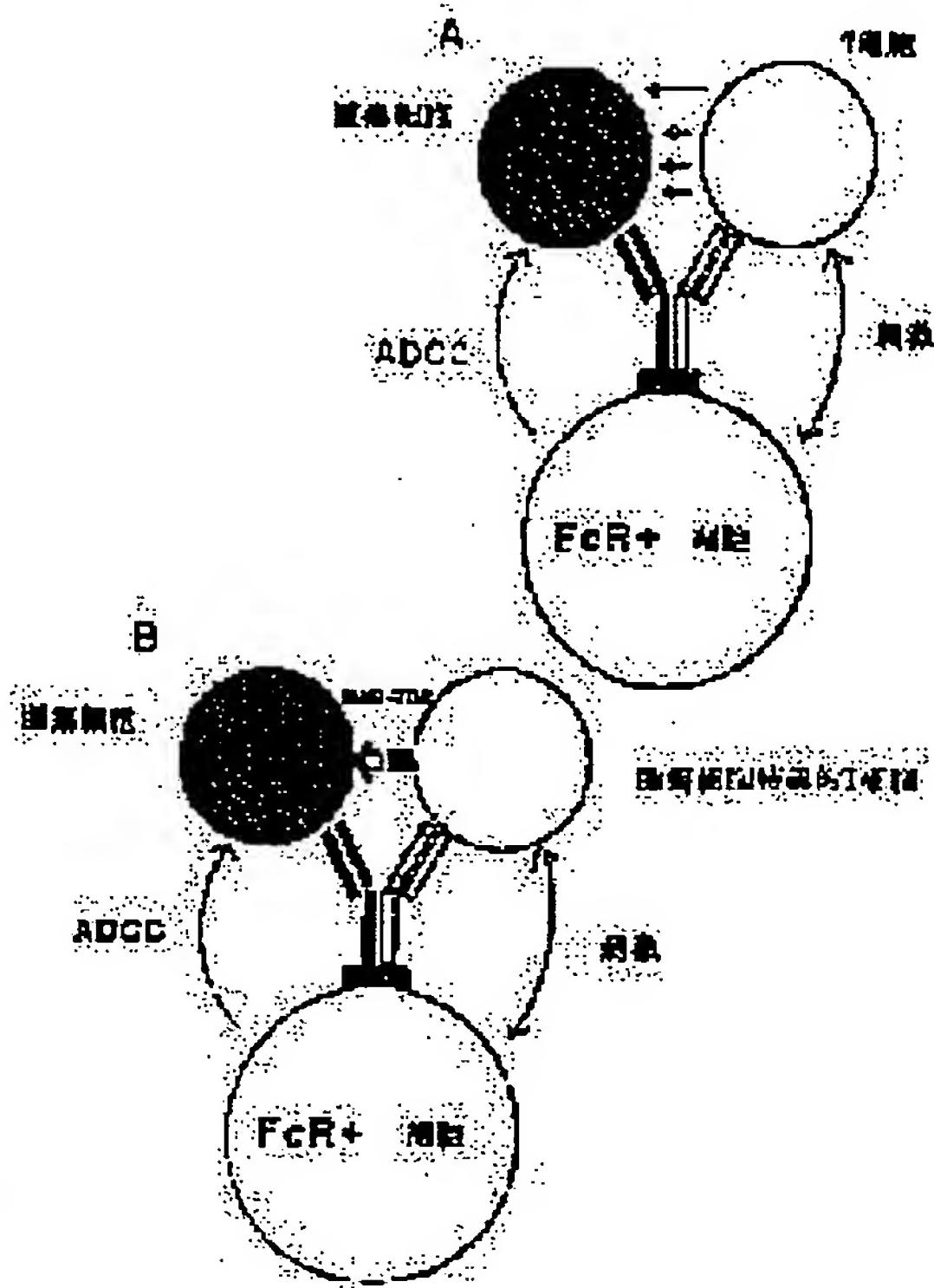
Priority number :	97 19725586	Priority date :	17.06.1997	Priority country :	DE
----------------------	-------------	--------------------	------------	-----------------------	----

(54) EX VIVO IMMUNIZATION USING HETEROGENIC COMPLETE DOUBLE SPECIFIC AND/OR TRIPLE SPECIFIC ANTIBODY

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To accomplish an antitumor immune system in human and animal ex vivo, useful for preventing and treating tumor diseases, by treating an isolated self tumor cell so as to prevent its survival in refusion and incubating the cell with a heterogenic double specific antibody, etc.

SOLUTION: (A) A self tumor cell previously isolated from a patient or an animal is treated by radiation irradiation, etc., so as to prevent its survival in the following refusion and (B) incubated with a double specific antibody such as complete heterogenic anti-CD3 x antitumor-related antigen antibody and/or a triple specific antibody for 10 minutes to 5 hours to accomplish an antilumor immune system in human and animal ex vivo. The component B is bonded to a T cell, to at least one antigen on a tumor cell and to an Fc receptor positive cell at its Fc part (in the case of double specific antibody) or in a third specificity (in the case of triple specific antibody).



LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 11.07.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against
examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

*** NOTICES ***

JPO and NCIPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The following processes: a Isolating-self-tumor cell;b In order to avoid the survival of that which follows regrouping Processing--this tumor cell;c The processed this tumor cell ; combined with an incubating--with perfect duplex of a different kind singularity and /Mie singularity antibody which show following properties:alpha-T cell ---; combined with at least one antigen on beta-tumor cell -- in the Fc part with gamma-Fc receptor positive cell (case of a bispecific antibody) Or (case of the Mie singularity antibody) the Homo sapiens containing joining [with the third singularity]-together; and the method of immunizing ex vivo of an animal.

[Claim 2] The approach according to claim 1 characterized by being chosen so that it can combine with the Fc receptor positive cell in which the above-mentioned antibody has the Fcgamma acceptors I, II, or III. [Claim 3] The approach according to claim 2 characterized by the ability of the above-mentioned antibody to combine with the activated neutrophil leucocyte which are monocyte, a macrophage, a dendritic cell, a "natural killer" cell (spontaneous killer cell), and/or an Fcgamma acceptor I positive cell.

[Claim 4] The approach according to claim 1 characterized by the ability for the above-mentioned antibody to guide a neoplasm reactivity complementary joint antibody, therefore guide a humoral immunity response.

[Claim 5] The approach according to claim 1 characterized by being chosen so that the above-mentioned antibody may combine with a T cell through CD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD28, and/or CD44. [Claim 6] The approach according to claim 1 that the above-mentioned antibody is characterized by being chosen as association to the Fc receptor positive cell so that the manifestation of CD40, CD80, CD86, ICAM-1, and/or LFA-3 and/or secretion of the cytokine by the Fc receptor positive cell may be succeedingly begun as a costimulatory antigen or it may increase.

[Claim 7] IL-1 whose above-mentioned antibody is cytokine, and IL-secretion of 2, IL-4, IL-6, IL-8, and IL-12 -- and/or, the approach according to claim 6 characterized by being chosen so that secretion of TNF-alpha may be increased.

[Claim 8] the above-mentioned bispecific antibody -- anti-CD-3 x an antitumor relevance antigen antibody -- and/or -- anti- -- CD4 x an antitumor relevance antigen antibody -- and/or -- anti- -- CD5 x an antitumor relevance antigen antibody -- and/or -- anti- -- CD6 x an antitumor relevance antigen antibody -- and/or -- anti- -- CD8 x an antitumor relevance antigen antibody -- and/or -- anti- -- CD2 x an antitumor relevance antigen antibody -- and/or -- anti- -- CD28 x an antitumor relevance antigen antibody -- and/or -- anti- -- CD44 x Approach according to claim 1 characterized by being chosen so that it may be an antitumor relevance antigen antibody.

[Claim 9] Combination of isotype of the following [bispecific antibody / above-mentioned] : Rat-IgG2b / mouse - IgG2a, Rat-IgG2b/mouse-IgG2b, rat-IgG2b / mouse-IgG3; Allotype [of rat-IgG2b / Homo sapiens-IgG1 rat-IgG2b/Homo sapiens-IgG2, and the rat-IgG2b / Homo sapiens-IgG3[East] It is the allotype of joint], and the rat-IgG2b / Homo sapiens-IgG4; rat-IgG2b / rat-IgG2c; mouse-IgG2a / Homo sapiens-IgG3[white races to G3m(st) = protein A. Do not combine with G3m(b+g) = protein A. Below, as *] mouse-IgG2a / mouse-[VH-CH1 shown, VL-CL]- Homo sapiens-IgG1-[hinge]-Homo sapiens-IgG3* -- VH-CH1, and -[CH2-CH3] mouse-IgG2a/rat-[VL-CL]- Homo sapiens-IgG1-[hinge]-Homo sapiens-IgG3* -[CH2-CH3] mouse-IgG2a / Homo sapiens-[VH-CH1 -- VL-CL]-Homo sapiens-IgG1-[hinge]-Homo sapiens-IgG3*-[CH2-CH3] mouse-[VH-CH1, VL-CL]- VH-CH1 and Homo sapiens-IgG1/rat-[VL-CL]-Homo sapiens-IgG -- a 1-[hinge]-Homo sapiens-IgG3*-[CH2-CH3] mouse -- VH-CH1 and -[VL-CL]-Homo sapiens-IgG4/rat-[VH-CH1 -- VL-CL --] - Homo sapiens - IgG -- four - [- a hinge --] - Homo sapiens - IgG -- four -- [- CH -- two -- N terminal region --] - Homo sapiens - IgG -- three -- * -- [- CH -- two -- a C terminal -- a field -- : -- > -- amino acid -- 251 -- place --] - Homo sapiens - IgG -- three -- *-[CH3] rat-IgG2b / mouse-[VH-CH1 -- VL-CL]-Homo sapiens-IgG1-[hinge-CH2-CH3] rat-IgG2b / mouse-[VH-CH1, VL-CL]-Homo sapiens-IgG2- [hinge-CH2-CH3] -- VH-CH1, and rat-IgG2b/mouse-[VL-CL]-Homo sapiens-IgG -- 3-[allotype of hinge-CH2-CH3 and the East] rat-IgG2b / mouse-[VH-CH1 -- VL-CL]-Homo sapiens - IgG4-[hinge-CH2-CH3] Homo sapiens-IgG1/Homo sapiens - VH-CH1 and [VL-CL]-Homo sapiens-IgG1-[hinge]-Homo sapiens-IgG3 -- *-[CH2-CH3] Homo sapiens-IgG1/rat-[VH-CH1 -- VL-CL --] - Homo sapiens - IgG -- one - [- a hinge --] - Homo sapiens - IgG --

four -- [-- CH -- two -- N terminal region --] - Homo sapiens - IgG --
three -- * -- [-- CH -- two -- a C terminal -- a field -- : -- > -- amino
acid -- 251 -- place --] - Homo sapiens - IgG -- three -- *-[CH3] Homo
sapiens-IgG1/mouse-[VH-CH1 -- VL-CL --] - Homo sapiens - IgG -- one
- [-- a hinge --] - Homo sapiens - IgG -- four -- [-- CH -- two -- N
terminal region --] - Homo sapiens - IgG -- three -- * -- [-- CH -- two --
a C terminal -- a field -- : -- > -- amino acid -- 251 -- place --] - Homo
sapiens - IgG -- three -- *-[CH3] Homo sapiens-IgG1/rat-[VH-CH1 --
VL-CL --] - Homo sapiens - IgG -- one - [-- a hinge --] - Homo sapiens -
IgG -- two -- [-- CH -- two -- N terminal region --] - Homo sapiens - IgG
-- three -- * -- [-- CH -- two -- a C terminal -- a field -- : -- > -- amino
acid -- 251 -- place --] - Homo sapiens - IgG -- three -- *-[CH3] Homo
sapiens-IgG1/mouse-[VH-CH1 -- VL-CL --] - Homo sapiens - IgG -- one
- [-- a hinge --] - Homo sapiens - IgG -- two -- [-- CH -- two -- N
terminal region --] - Homo sapiens - IgG -- three -- * -- [-- CH -- two --
a C terminal -- a field -- : -- > -- amino acid -- 251 -- place --] - Homo
sapiens - IgG -- three -- *-[CH3] Homo sapiens-IgG1/rat-[VH-CH1 --
VL-CL]-Homo sapiens-IgG1-[hinge]-Homo sapiens - IgG3*- [CH2-CH3]
Homo sapiens-IgG1/mouse - VH-CH1 and [VL-CL]-Homo
sapiens-IgG1-[hinge]-Homo sapiens-IgG3 -- *-[CH2-CH3] Homo
sapiens-IgG2/Homo sapiens-[VH-CH1 -- VL-CL]-Homo
sapiens-IgG2-[hinge]-Homo sapiens - IgG3*- [CH2-CH3] Homo
sapiens-IgG4/Homo sapiens - VH-CH1 and [VL-CL]-Homo
sapiens-IgG4-[hinge]-Homo sapiens-IgG3 -- *-[CH2-CH3] Homo
sapiens-IgG4/Homo sapiens-[VH-CH1 -- VL-CL --] - Homo sapiens - IgG
-- four - [-- a hinge --] - Homo sapiens - IgG -- four -- [-- CH -- two --
N terminal region --] - Homo sapiens - IgG -- three -- * -- [-- CH -- two --
a C terminal -- a field -- : -- > -- amino acid -- 251 -- place --] -
Homo sapiens - IgG -- three -- *-[CH3] mouse-IgG2b / rat-[VH-CH1 --
VL-CL]-Homo sapiens-IgG1-[hinge]-Homo sapiens - IgG3*- [CH2-CH3]
mouse-IgG2b / Homo sapiens - VH-CH1 and [VL-CL]-Homo
sapiens-IgG1-[hinge]-Homo sapiens-IgG3 -- *-[CH2-CH3] mouse-IgG2b /
mouse-[VH-CH1 -- VL-CL]-Homo sapiens-IgG1-[hinge]-Homo
sapiens-IgG3*- [CH2-CH3] mouse-[VH-CH1, VL-CL]-Homo
sapiens-IgG4/rat-[VH-CH1, VL-CL]-Homo sapiens-IgG4-[hinge]-Homo
sapiens-IgG4-[CH2]-Homo sapiens-IgG3 -- *-[CH3] Homo
sapiens-IgG1/rat-[VH-CH1 -- VL-CL]-Homo sapiens-IgG1-[hinge]-Homo
sapiens-IgG4-[CH2]-Homo sapiens-IgG3 -- *-[CH3] Homo
sapiens-IgG1/mouse-[VH-CH1 -- VL-CL]-Homo sapiens-IgG1-[
hinge]-Homo sapiens-IgG4-[CH2]-Homo sapiens-IgG3 -- *-[CH3] Homo
sapiens-IgG4/Homo sapiens-[VH-CH1 -- VL-CL]-Homo
sapiens-IgG4-[hinge]-Homo sapiens - IgG4-[CH2]-Homo sapiens-IgG3*- the

approach of claim 1 characterized by being chosen or more from one of [the CH(s)3] to the 8th term given in any 1 term.

[Claim 10] The approach according to claim 1 characterized by choosing the above-mentioned bispecific antibody from a different-species rat / mouse bispecific antibody.

[Claim 11] The approach according to claim 1 characterized by the above-mentioned Mie singularity antibody having the third singularity for association to T cell brachium conjunctivum, tumor cell brachium conjunctivum, and an Fc receptor positive cell.

[Claim 12] the above-mentioned Mie singularity antibody -- anti-CD-3 x an antitumor relevance antigen antibody -- and/or -- anti- -- CD4 x an antitumor relevance antigen antibody -- and/or -- anti- -- CD5 x an antitumor relevance antigen antibody -- and/or -- anti- -- CD6 x an antitumor relevance antigen antibody -- and/or -- anti- -- CD8 x an antitumor relevance antigen antibody -- and/or -- anti- -- CD2 x an antitumor relevance antigen antibody -- and/or -- anti- -- CD28 x an antitumor relevance antigen antibody -- and/or -- anti- -- CD44 x Approach according to claim 11 characterized by being chosen so that it may be an antitumor relevance antigen antibody.

[Claim 13] The approach according to claim 1 characterized by what (short-term incubation) the tumor cell charged by the antibody is prepared for regrouting in the above-mentioned process c after carrying out the incubation of the tumor cell to perfect different-species duplex singularity and/or the Mie singularity antibody.

[Claim 14] The approach according to claim 1 which adds a mononuclear cell after the incubation of a tumor cell with an antibody, and is characterized by what (long-term incubation) an incubation is continued for or it carries out the incubation of a tumor cell with an antibody in the above-mentioned process c with the mononuclear cell (PBMC= peripheral blood liquid mononuclear cell) of peripheral blood liquid.

[Claim 15] Claim 13 to which the above-mentioned tumor cell is characterized by incubating with the period antibody of 5 hours from 10 minutes, or an approach given in 14 terms.

[Claim 16] Claim 13 to which the above-mentioned tumor cell is characterized by incubating with the period antibody for 15 to 120 minutes, or an approach given in 14 terms.

[Claim 17] The approach according to claim 14 that the above-mentioned single nucleus peripheral blood liquid cell is characterized by the thing for a tumor cell and an antibody, and one to 14 days done for period incubation.

[Claim 18] The approach according to claim 14 characterized by adding the above-mentioned single nucleus peripheral blood liquid cell in the amount of about 108 to 1010 cells.

- [Claim 19] The approach according to claim 1 characterized by adding the above-mentioned tumor cell in the amount of 10⁷ to 10⁹ cells.
- [Claim 20] The approach according to claim 1 characterized by adding the above-mentioned duplex singularity and/or the Mie singularity antibody in the amount of 2 to 100 microg.
- [Claim 21] The approach according to claim 1 that processing of the tumor cell in the above-mentioned process b is characterized by radiation irradiation carrying out.
- [Claim 22] The approach according to claim 1 characterized by for the above-mentioned duplex singularity and/or the Mie singularity antibody being able to activate an Fc receptor positive cell, and a manifestation and/or costimulatory antigen or cytokine guiding or increasing by it.
- [Claim 23] Use of the tumor cell containing the preparation object according to claim 1 or 14 in prevention and the therapy of a neoplastic disease.
- [Claim 24] Use according to claim 23 for guiding antitumor immunity nature.
- [Claim 25] The approach according to claim 1 in preparation of the self-tumor cell treated using the different-species duplex singularity and/or the Mie singularity antibody for regrouting in the patient by whom the self-tumor cell is got, or an animal.
- [Claim 26] The pharmaceutical constituent containing the tumor cell preparation object obtained by the approach of claims 1 or 14.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and NCIPPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]**[0001]**

[Field of the Invention] This invention relates to use of the product of the above-mentioned approach in induction of antitumor immunity especially in prevention and the therapy of a neoplastic disease similarly about the approach of ex vivo immunization using a perfect bispecific antibody and/or the Mie singularity antibody by different species.

[0002] In spite of the advance in the chemotherapy and radiotherapy which were finished in the past several years, only the prediction which is not yet very desirable is possible for the malignant disease in *Homo sapiens* called the breast cancer which progressed, for example. Generally this disease cannot be recovered. So, it is necessary to develop a new therapy strategy. In this viewpoint, great expectation is put on the immunity therapy approach used in order to guide the immune system of the patient who refuses a neoplasm. It is known well that a neoplasm relevance antigen can exist on a tumor cell, especially an immune system can recognize these antigens well, and a malignant cell can be attacked. However, a neoplasm is developing various strategies which enable them to avoid an immune response. presentation with this cell inadequate [for example, a neoplasm relevance antigen] -- and/or, this is finished by activation with the inadequate neoplasm specific T cell which generally exists.

[0003] With the new case per [43,000 / about] year, a breast cancer occupies the greatest location of statistics of the female gun in Germany. Only a number smaller than 1/3 of the woman currently troubled by lymphadenopathia at the time of a diagnosis survives for ten years without a recurrence.

[0004]

[Description of the Prior Art] The place to current, the immunity therapy-approach turned to a breast cancer is restricted to the approach for

a nonspecific stimulus like the therapy by BCG or the REBAMI SOL, and is restricted to use of the LAK cell and spontaneous killer cell using IL-2 (3 4). However, even the certification made rather inconvenient [the therapy by;BCG which the type of an immunity therapy used does not provide with any proof to extension of a life] exists (3). Also in the neoplasm of the type of others [activation / of a cell / nonspecific], it succeeds in the attempt turned to induction of a specific immune response since it was very effective.

[0005] For example, the T cell re-deviation nature bispecific antibody was used in the therapy of a neoplasm. These antibodies combine T cell receptor complex by one of the brachium conjunctivum of the, and combine the neoplasm relevance antigen on a tumor cell with other arms. activation of the T cell produced as a result, and the formation of regarding-the-place contiguity of a tumor cell -- respectively -- induction of apoptosis -- or destruction of a tumor cell is drawn by cytokine like TNF-alpha or par FORIN.

[0006] The antibody used by the oncotherapy in a well-known technique was directly poured in into the patient. This type of approach shows [- An antibody may usually be combined also with an organization during application by in vivo by that neoplasm brachium conjunctivum.] some following faults. :
- It needs the antibody of a high dose.; - A severe side effect may arise.;

[0007]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] It is the purpose of this invention to offer the thing aiming at finishing the cure, especially antitumor immunity system of the malignant disease in new Homo sapiens.

[0008] According to this invention, this purpose is finished by the approach in which the characterization is carried out to the detail by claim 1. The desirable embodiment of this approach becomes clear from a subordination claim.

[0009] The end product of the approach of this invention is a tumor cell preparation object containing an antibody. This tumor cell preparation object is used in prevention and the therapy of a neoplastic disease by guiding antitumor immunity nature.

[0010] By using the approach of this invention, a self-tumor cell is treated using different-species duplex singularity and/or the Mie singularity antibody, and since it is regrooted in the patient by whom the self-tumor cell is got, or an animal, the tumor cell preparation object obtained by this approach is used.

[0011] Furthermore, this invention relates to use of the approach especially offered especially according to an antitumor immunity system and this invention in achievement of a long-term immune system preferably and tumor cell preparation object in prevention and the therapy of a neoplastic

disease.

[0012] It is shown by the experiment offered in this invention, especially an example 2 that long-term continuation tumor immunity is offered. The result of the experiment conducted in the mouse can be moved also to Homo sapiens. It is expected that it may be provided when the long-term immunity of several years uses this invention. A tumor cell which is described by this invention carries out deletion of the usual function by one or more mutations, or are all those cells from which the function is usually changing. A tumor cell can be increased by the non-controlling method for these mutations.

[0013] The tumor immunity according to this invention is defined by activating the immune system of the body of the living thing to a self-neoplasm like the approach by which a self-neoplasm is long-term or permanent, it is clear, and a certain destruction and/or control are attained.

[0014] According to this invention, the neoplasm of all the classes under the definition given the account of a top may be treated by this approach. Each gun of an epithelium neoplasm, a gland gun, a join intestinal cancer, a breast cancer, an ovarian cancer, lungs, a throat, a nose, and a lug may be treated especially. Still more desirable leukemia and non-epithelium neoplasm like a lymphocyte, and the neoplasm of virus valence like the hepatophyma may be treated.

[0015] According to this invention, a different-species full duplex singularity antibody and/or the Mie singularity antibody are used. These antibodies are contacted by the patient by ex vivo using the tumor cell (self-tumor cell) obtained beforehand. In order to prevent survival of a tumor cell in continuing regrouting, before a tumor cell contacts an antibody, it is processed in the approach of being essentially known like radiation irradiation. Following on radiation irradiation, a tumor cell incubates with a perfect different-species bispecific antibody and/or the Mie singularity antibody. According to this invention, all antibodies are not used, it must be perfect, namely, only an antibody with a functional Fc part must be used, and they must be the antibodies which consist of a class (also a subclass combination and a fragment again) which it is different species in nature, i.e., is different, and/or the immunoglobulin H chain of the origin (seed).

[0016] These perfect different-species duplex singularity and/or the Mie singularity antibody are combining [with :alpha-T cell which will be chosen so that it may have the following properties further];beta. – It is combining [with the antigen on at least one tumor cell];gamma. – It is combining [with an Fc receptor positive cell]–with Fc part (in case of bispecific antibody), or third singularity (in case of Mie singularity antibody); [0017]. Especially, as a desirable embodiment of this invention, an Fc receptor positive cell is activated for perfect different-species duplex singularity and/or the Mie singularity antibody, and it chooses so that the manifestation of cytokine

and/or a costimulatory antigen can be guided or increased by it. The tumor cell preparation object obtained so that the above-mentioned antibody might be included is prepared for the further regrouting. It is moved to the equipment suitable for regrouting.

[0018] In the case of the Mie singularity antibody, association to an Fc receptor positive cell is preferably produced through the Fc receptor of an Fc receptor positive cell through other antigens like the mannose acceptor on an Fc receptor positive cell (antigen presenting cell).

[0019] Only use of the antibody described the approach of this invention and here ensures development of an antitumor immunity system after regrouting of the antibody into the patient by whom the tumor cell is got before.

Preferably, regrouting is a patient after the therapy of a primitive neoplasm, and is carried out by the patient in the case of the disease (MRD) of the minimum desirable remainder. Probably, in the patient who has the high risk of a recurrence although it has almost no residual tumor cell, especially use of the approach offered according to this invention will be effective.

[0020] By using the approach of this invention, it is possible to avoid the fault which is known from the well-known technique and described by the detail by the following.

[0021] According to this invention, although a useful different-species bispecific antibody and/or the Mie singularity antibody are essentially known things in a sense, they are described for the first time by another semantics in this application. It is anti-CD-3 [which is used by epithelium neoplasm like a breast cancer as an example over bsab]. x An anti-epcam antibody exists.

[0022] This invention is followed and it is :1. which can distinguish the variation of the approach of 2. A short-term incubation and 2. Long-term incubation.

[0023] a short-term incubation -- a self-neoplasm -- perfect different-species duplex singularity and/or the Mie singularity antibody -- the period of 10 minutes to 5 hours, or 10 minutes to 3 hours -- or -- further -- desirable -- the period of 15 minutes to 2 hours -- the thing of 1 hour to do for a period incubation is said from 15 minutes still more preferably. And it prepares by this approach for an antibody and regrouting of the charged tumor cell.

[0024] In order that a long-term incubation may charge a self-tumor cell with an antibody, it says 2 hours and carrying out an incubation from 15 minutes still more preferably for 1 hour from 15 minutes preferably from about 10 minutes for 5 hours. then, a patient's blood cell -- desirable -- the mononuclear cell (PBMC=peripheral blood mononucleated cell) of peripheral blood liquid -- adding -- and -- and this mixture -- one to 14 days -- desirable -- three to ten days -- and it was more preferably called six to ten days -- long-term -- period incubation is carried out. It is that another

approach of treatment contacts a self-tumor cell to instead of directly with a bispecific antibody and/or the Mie singularity antibody, and a patient's blood cell. By this approach, carrying out "it puts in and the wisdom of much immunocyte to a neoplasm is carried out" ("priming") is finished by ex vivo. These cells are regrooted in a patient after that. A long-term incubation draws internalization and decomposition of an antibody again.

[0025] The immunocyte pretreated by the approach by which the result in preliminary in vitro was described can destroy a tumor cell that there is still no addition of duplex singularity and/or the Mie singularity antibody (example 1 reference).

[0026] In a short-term incubation as well as a long-term incubation; a T cell is produced in; coincidence re-deflected to a tumor cell after association of the Fc receptor positive cell to Fc parts of duplex singularity and/or the Mie singularity antibody regrooting by the duplex singularity and/or the Mie singularity antibody which were fixed on the tumor cell. by association to Fc part of the perfect bispecific antibody fixed (respectively -- a T cell or tumor cell top), this draws activation of an Fc receptor positive cell.

[0027] Since a success of immunization is increased, it is possible to medicate an abundance patient with the tumor cell processed using the antibody according to each of the short-term incubation method or the long-term incubation method suitably not only in once.

[0028] On a tumor cell, upper accommodation of MHC1 arises like intracellular processing MASHINERI (proteasome complex) for emission of the cytokine (it is (like INF-gamma and TNF-alpha)) which approached the tumor cell immediately. Cytokine is emitted for bispecific antibody mediation nature activation of a T cell, and a accessory cell (drawing 1 and 3 reference). That is, it not only receives phagocytosis, but a tumor cell is destroyed by perfect bsab and the antitumor immunity system increases by it.

[0029] It depends for activation of the Fc receptor positive cell by bsab on the subclass or subclass combination of basb, respectively. in As shown in the experiment by vitro, bsab of the subclass combination of mouse IgG2a/rat IgG2b cannot perform being activated possible [a comparison of (1) and these cells] clearly, although it is combinable with an Fc receptor positive cell (2).

[0030] Although combining perfect bsab with a T cell through one of the brachia conjunctivum (for example, CD3 or CD2 being received), and being activated is made to coincidence, the costimulatory signal of the Fc receptor positive cell origin combined with Fc part of bsab will be transmitted to the T cell. That is, only the combination of the transfer produced in the coincidence of the costimulatory signal of the T cell activation through one brachium conjunctivum of bsab and the Fc receptor positive cell origin to a T

cell causes effective T cell activation (drawing 1 A). It will activate insufficiently [a tumor cell] and, as for the neoplasm specific T cell which is anergy nature, reactivation will also be carried out according to pretreatment by ex vivo of this invention (drawing 1 B).

[0031] The further important field in induction of an antitumor immunity system is the possibility of presentation of the neoplasm constituent by the accessory cell (monocyte/macrophage, a dendritic cell, and NK—"natural killer"—cell) which is turned by phagocytosis, processing, and bsab and is activated. According to the classic mechanism of this antigen presentation, neoplasm specific CD4 cell as well as a CD8 positive cell may be produced. Furthermore, neoplasm specific CD4 cell plays an important role for a T-B cell by induction of a humoral immune response in the flow of an operation.

[0032] It can combine with the T cell receptor complex of a T cell by one brachium conjunctivum, and duplex singularity and the Mie singularity antibody can be combined with the neoplasm relevance antigen on a tumor cell by the second brachium conjunctivum. They activate the T cell which emits cytokine and which is caused especially or destroys a tumor cell according to an apoptosis mediation nature mechanism by it. Furthermore, in the flow of the activation by the bispecific antibody, it enables a T cell clearly to recognize a neoplasm specific antigen through the acceptor, and long-term continuation immunization starts by it (drawing 1 B). It is important at especially the point of guiding perfect Fc part of duplex singularity or the Mie singularity antibody intervening association to a accessory cell like monocyte / macrophage, and a dendritic cell, and these cells becoming these selves cytotoxicity, and/or transmitting the important costimulatory signal to a T cell to coincidence with this point (drawing 1 B). A T cell response is considered that a certain extent can be guided also to a strange neoplasm specific peptide by this approach.

[0033] It will function as costimulation-ization which occurs in the coincidence of this T cell by the accessory cell combined with Fc part of the re-deviation of the neoplasm specific T cell which can be anergy-ized to a tumor cell by duplex singularity and/or the Mie singularity antibody and duplex singularity, or the Mie singularity antibody reversing the anergy of a cytotoxic T cell (CTL). That is, the T cell tolerance which exists in a patient to a neoplasm may be neutralized using perfect different-species duplex singularity and/or the Mie singularity antibody, and a long-term continuation tumor immunity system may be guided by it.

[0034] The last field is supported with the data in preliminary in vivo from an experiment using the mouse which guided the long-term continuation antitumor immunity system to the processing which used an affiliated neoplasm and affiliated perfect bsab succeedingly. In these experiments, it succeeded using the first neoplasm injection back bsab, and all 14 survived

without the further administration of one neoplasm injection which will be accepted after the first injection in 144 days in the animal of 14 which might be processed of bsab (example 2 reference).

[0035] another advantage in immunization by ex vivo by duplex singularity and/or the Mie singularity antibody -- (i) Minimizing the side effect which may happen, and (ii) controlling association of the neoplasm brachium conjunctivum to a tumor cell outside the body -- and (iii) It is using duplex singularity and the Mie singularity antibody few as much as possible. The approach 2 differs exists in the approach the detail is probably mainly described to be below. The duplex singularity or the Mie singularity antibody for which the important point about a long-term incubation is used is disappearing during the planned incubation period and decomposed. By this approach, this immunization will avoid the redundant drugs improvement process.

[0036]

[Means for Solving the Problem] In the short-term and long-term incubation method, a tumor cell incubates from 15 minutes beyond the period of 5 hours from an antibody and 10 minutes for 1 hour preferably [it is desirable, is still more desirable till 3 hours, and / till 2 hours]. This incubation is 4 to 25 degrees C in temperature, and is especially carried out at 4 to 10 degrees C preferably. This incubation is carried out in the sterilization environment of a buffer physiological saline with neutral desirable pH. In the case of a short-term incubation, regrouting into a patient is carried out immediately after that. In the long-term incubation method, it continues at this preincubation, a single nucleus peripheral blood liquid cell is added, and it will incubate still more preferably from 3 more preferably on the 10th with the period on further 1 to the 14th, and the tumor cell/antibody which pre incubated for ten days from 6. This incubation is preferably carried out at 37 degrees C in an incubator under sterilization condition as well as the bottom of GMP condition (product manufactured appropriately (Good Manufacturing Production=GMP)). As description was carried out [above-mentioned], under a long-term incubation, you may incubate with a tumor cell and an antibody under the condition for which the blood cell was instead suitable.

[0037] It has only as instantiation the intention of the incubation condition mentioned above. Depending on the tumor cell and antibody which are used, other incubation condition different generally, such as a period, temperature, and condition, may be used. Probably, this contractor is able to establish this condition by easy experiment.

[0038] The tumor cell between preincubation is the amount of 10⁷ to 10⁹ cells preferably, and is used in the amount of about 10⁸ cells still more preferably. Naturally this contractor can choose a different incubation condition which may be measured by the experiment of a laboratory (for

example, change of the number of cells, and an incubation period). The duplex singularity and/or the Mie singularity antibody which are used in the approach of this invention are the amount of 2 to 100microg, are the amount of 5 to 70microg still more preferably, and are especially added in the amount of 5 to 50microg preferably.

[0039] In order to avoid the further survival of a tumor cell, radiation irradiation of the self-tumor cell used is carried out. For example, gamma radiation is used, for example, it is used with radiant quantities of 50 to 100Gy. In another embodiment of this invention, a self-tumor cell is processed by mitomycin-C in order to avoid the further survival with the chemical matter, for example.

[0040] The antibody used according to this invention may reactivate the neoplasm specific T cell which is in an anergy condition preferably. Furthermore, they can guide a neoplasm reactivity complementary joint antibody, and can guide a humoral immunity response by it.

[0041] Association is preferably produced with a T cell through CD3, CD2, CD4, CD5, CD6, CD8, CD28, and/or CD44. The Fc receptor positive cell has the Fcgamma acceptors I, II, or III at least.

[0042] The antibody which may be used according to this invention is combinable with the activation neutrophil leucocyte which are monocyte, a macrophage, a dendritic cell, a "natural killer" cell (spontaneous killer cell), and/or an Fcgamma acceptor 1-positive cell.

[0043] The antibody which may be used according to this invention draws the induction or increase in the manifestation of CD40, CD80, CD86, ICAM-1, and/or LFA-3 like a costimulatory antigen, and/or draws the cytokine secretion by the Fc receptor positive cell. This cytokine is IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, and/or TNF-alpha preferably.

[0044] Association to a T cell is preferably performed through the T cell receptor complex of a T cell.

[0045] the bispecific antibody which may be used according to this invention -- desirable -- :anti-CD-3 x an antitumor relevance antigen antibody -- and/or -- anti- -- CD4 x an antitumor relevance antigen antibody -- and/or -- anti- -- CD5 x an antitumor relevance antigen antibody -- and/or, anti-CD6 x an antitumor relevance antigen antibody -- and/or -- anti- -- CD8 x an antitumor relevance antigen antibody -- and/or -- anti- -- CD2 x an antitumor relevance antigen antibody -- and/or -- anti- -- CD28 x an antitumor relevance antigen antibody -- and/or -- anti- -- CD44 x It is an antitumor relevance antigen antibody.

[0046] the Mie singularity antibody which may be used according to this invention -- desirable -- :anti-CD-3 x an antitumor relevance antigen antibody -- and/or -- anti- -- CD4 x an antitumor relevance antigen antibody -- and/or -- anti- -- CD5 x an antitumor relevance antigen

antibody -- and/or, anti-CD6 x an antitumor relevance antigen antibody -- and/or -- anti- -- CD8 x an antitumor relevance antigen antibody -- and/or -- anti- -- CD2 x an antitumor relevance antigen antibody -- and/or -- anti- -- CD28 x an antitumor relevance antigen antibody -- and/or -- anti- -- CD44 x It is an antitumor relevance antigen antibody.

[0047] According to this invention, the useful Mie singularity antibody has at least the brachium conjunctivum combined with T cell brachium conjunctivum, tumor cell brachium conjunctivum, and an Fc receptor positive cell. The thing of the last of the mentioned brachium conjunctivum is anti-Fc receptor brachium conjunctivum or mannose acceptor brachium conjunctivum. [0048] Bispecific antibodies are a different-species perfect rat / mouse bispecific antibody preferably.

[0049] According to this invention, useful duplex singularity and the useful Mie singularity antibody are activated, and a T cell is re-deflected to a tumor cell. The different-species full duplex singularity antibody which will be used preferably : chosen from the combination of the following one or more isotypes Rat-IgG2b / mouse - IgG2a, Rat-IgG2b/mouse-IgG2b, rat-IgG2b / mouse-IgG3; Allotype [of rat-IgG2b / Homo sapiens-IgG1 rat-IgG2b/Homo sapiens-IgG2, and the rat-IgG2b / Homo sapiens-IgG3[East] It is the allotype of joint], and the rat-IgG2b / Homo sapiens-IgG4; rat-IgG2b / rat-IgG2c; mouse-IgG2a / Homo sapiens-IgG3[white races to G3m(st) = protein A. Do not combine with G3m(b+g) = protein A. Below, as *] mouse-IgG2a / mouse-[VH-CH1 shown, VL-CL]- Homo sapiens-IgG1-[hinge]-Homo sapiens-IgG3* -- VH-CH1, and -[CH2-CH3] mouse-IgG2a/rat-[VL-CL]- Homo sapiens-IgG1-[hinge]-Homo sapiens-IgG3* -[CH2-CH3] mouse-IgG2a / Homo sapiens-[VH-CH1 -- VL-CL]-Homo sapiens-IgG1-[hinge]-Homo sapiens-IgG3*-[CH2-CH3] mouse-[VH-CH1, VL-CL]- VH-CH1 and Homo sapiens-IgG1/rat-[VL-CL]-Homo sapiens-IgG -- a 1-[hinge]-Homo sapiens-IgG3*-[CH2-CH3] mouse -- VH-CH1 and -[VL-CL]-Homo sapiens-IgG4/rat-[VH-CH1 -- VL-CL --] - Homo sapiens - IgG -- four - [- a hinge --] - Homo sapiens - IgG -- four -- [- CH -- two -- N terminal region --] - Homo sapiens - IgG -- three -- * -- [- CH -- two -- a C terminal -- a field -- : -- > -- amino acid -- 251 -- place --] - Homo sapiens - IgG -- three -- *-[CH3] rat-IgG2b / mouse-[VH-CH1 -- VL-CL]-Homo sapiens-IgG1-[hinge-CH2-CH3] rat-IgG2b / mouse-[VH-CH1, VL-CL]-Homo sapiens-IgG2- [hinge-CH2-CH3] -- VH-CH1, and rat-IgG2b/mouse-[VL-CL]-Homo sapiens-IgG -- 3-[allotype of hinge-CH2-CH3 and the East] rat-IgG2b / mouse-[VH-CH1 -- VL-CL]-Homo sapiens - IgG4-[hinge-CH2-CH3] Homo sapiens-IgG1/Homo sapiens - VH-CH1 and [VL-CL]-Homo sapiens-IgG1-[hinge]-Homo sapiens-IgG3 -- *-[CH2-CH3] Homo sapiens-IgG1/rat-[VH-CH1 -- VL-CL

--] - Homo sapiens - IgG -- one - [-- a hinge --] - Homo sapiens - IgG -- four -- [-- CH -- two -- N terminal region --] - Homo sapiens - IgG -- three -- * -- [-- CH -- two -- a C terminal -- a field -- : -- > -- amino acid -- 251 -- place --] - Homo sapiens - IgG -- three -- *-[CH3] Homo sapiens-IgG1/mouse-[VH-CH1 -- VL-CL --] - Homo sapiens - IgG -- one - [-- a hinge --] - Homo sapiens - IgG -- four -- [-- CH -- two -- N terminal region --] - Homo sapiens - IgG -- three -- * -- [-- CH -- two -- a C terminal -- a field -- : -- > -- amino acid -- 251 -- place --] - Homo sapiens - IgG -- three -- *-[CH3] Homo sapiens-IgG1/rat-[VH-CH1 -- VL-CL --] - Homo sapiens - IgG -- one - [-- a hinge --] - Homo sapiens - IgG -- two -- [-- CH -- two -- N terminal region --] - Homo sapiens - IgG -- three -- * -- [-- CH -- two -- a C terminal -- a field -- : -- > -- amino acid -- 251 -- place --] - Homo sapiens - IgG -- three -- *-[CH3] Homo sapiens-IgG1/mouse-[VH-CH1 -- VL-CL --] - Homo sapiens - IgG -- one - [-- a hinge --] - Homo sapiens - IgG -- two -- [-- CH -- two -- N terminal region --] - Homo sapiens - IgG -- three -- * -- [-- CH -- two -- a C terminal -- a field -- : -- > -- amino acid -- 251 -- place --] - Homo sapiens - IgG -- three -- *-[CH3] Homo sapiens-IgG1/rat-[VH-CH1 -- VL-CL]-Homo sapiens-IgG1-[hinge]-Homo sapiens - IgG3*-[CH2-CH3] Homo sapiens-IgG1/mouse - VH-CH1 and [VL-CL]-Homo sapiens-IgG1-[hinge]-Homo sapiens-IgG3 -- *-[CH2-CH3] Homo sapiens-IgG2/Homo sapiens-[VH-CH1 -- VL-CL]-Homo sapiens-IgG2-[hinge]-Homo sapiens - IgG3*-[CH2-CH3] Homo sapiens-IgG4/Homo sapiens - VH-CH1 and [VL-CL]-Homo sapiens-IgG4-[hinge]-Homo sapiens-IgG3 -- *-[CH2-CH3] Homo sapiens-IgG4/Homo sapiens-[VH-CH1 -- VL-CL --] - Homo sapiens - IgG -- four - [-- a hinge --] - Homo sapiens - IgG -- four -- [-- CH -- two -- N terminal region --] - Homo sapiens - IgG -- three -- * -- [-- CH -- two -- a C terminal -- a field -- : -- > -- amino acid -- 251 -- place --] - Homo sapiens - IgG -- three -- *-[CH3] mouse-IgG2b / rat-[VH-CH1 -- VL-CL]-Homo sapiens-IgG1-[hinge]-Homo sapiens - IgG3*-[CH2-CH3] mouse-IgG2b / Homo sapiens - VH-CH1 and [VL-CL]-Homo sapiens-IgG1-[hinge]-Homo sapiens-IgG3 -- *-[CH2-CH3] mouse-IgG2b / mouse-[VH-CH1 -- VL-CL]-Homo sapiens-IgG1-[hinge]-Homo sapiens-IgG3*-[CH2-CH3] mouse-[VH-CH1, VL-CL]-Homo sapiens-IgG4/rat-[VH-CH1, VL-CL]-Homo sapiens-IgG4-[hinge]-Homo sapiens-IgG4-[CH2]-Homo sapiens-IgG3 -- *-[CH3] Homo sapiens-IgG1/rat-[VH-CH1 -- VL-CL]-Homo sapiens-IgG1-[hinge]-Homo sapiens-IgG4-[CH2]-Homo sapiens-IgG3 -- *-[CH3] Homo sapiens-IgG1/mouse-[VH-CH1 -- VL-CL]-Homo sapiens-IgG1-[hinge]-Homo sapiens-IgG4-[CH2]-Homo sapiens-IgG3 -- *-[CH3] Homo sapiens-IgG4/Homo sapiens-[VH-CH1 -- VL-CL]-Homo

sapiens-IgG4-[hinge]-Homo sapiens -IgG4-[CH2]-Homo sapiens-IgG3*- [CH3 [0050]] According to this invention, a useful antibody is a monoclonal, a chimera, recombination, composition, a semisynthesis, or a perfect antibody that was embellished chemically, for example, has Fv, Fab, scFv, or F(ab)2 fragment preferably.

[0051] The antibody (called a "hominization antibody") changed by the approach that it is preferably suitable for the application to Homo sapiens of the antibody of the Homo sapiens origin, a derivative, a fragment, or them is used (for example, Transplantation(s) 57 (1994), such as J.Exp.Med.175 (1992), 217;Mocikat(s), etc., such as Shalaby, 405).

[0052] An antibody various type [above-mentioned] and preparation of a fragment are clear to this contractor. For example, preparation of the monoclonal antibody of the mammalian origins, such as Homo sapiens, a rat, a mouse, a rabbit, or a goat, may be preferably carried out using a common approach which is described by Kohler, Milstein (Nature 256 (1975), 495), Harlow and Lane (Antibodies, A Laboratory Manual (1988), Cold Spring Harbor), or Galfe (73 (1981) Meth.Enzymol. 3).

[0053] It is possible to prepare the antibody described by the recombinant DNA method according to a technique still clearer to this contractor (Proc.Natl.Acad.Sc.USA 90 (1993), such as J.Immunol.154 (1995), 4576;Hollinger(s), etc., such as Kurucz, 6444).

[0054] The antibody used by this approach may be designed and produced by this contractor without too much burden. (11) describes the approach for obtaining the duplex singularity and the Mie singularity antibody which are used for this invention from the list of indicated references, especially a reference (7). [0055] Especially documents (9), such as Greenwood, indicate exchange of the single immunoglobulin domain (for example, CH2) by the croning process for which were suitable. The combination of the new antibody described by claim 9 may be offered by using these croning processes. : which has the following as an example -- Homo sapiens-(VH-CH1, VL-CL)-Homo sapiens IgG4-(hinge)-Homo sapiens IgG4(N terminal region of CH2)-Homo sapiens IgG3*(C-terminal field of CH2: the 251st place of > amino acid)-Homo sapiens IgG3* (CH3).

[0056] bispecific antibody: -- antibody [for preparation of Homo sapiens IgG4/Homo sapiens-(VH-CH1, VL-CL)-Homo sapiens IgG4-(hinge)-Homo sapiens IgG4(N terminal region of CH2)-Homo sapiens IgG3*(C-terminal field of CH2: the 251st place of > amino acid)-Homo sapiens IgG3* (CH3)]: -- the combination using Homo sapiens IgG 4 is prepared by single cell fusion which is described by the document (6).

[0057] On the other hand, although preparation of an antibody with the singularity from which 2 called a bispecific antibody differs may be carried out using a recombinant DNA method, on the other side, it may be carried

out by what is called the hybrid hybridoma uniting method (for example, Nature(s) 305 (1993), such as Milstein, 537 reference). By this approach, the hybridoma cell lineage which produces the antibody which has one desirable singularity, respectively is united, and the recombination cell lineage which produces an antibody with both singularity is identified and isolated.

[0058] The problem which exists in this invention may be solved by duplex singularity and the Mie singularity antibody as long as the property and activity by which the characterization is carried out to claim 1 are shown. Preparation of the antibody which has the singularity of 2 and 3 as shown below is described by the detail. Offering this duplex singularity and the Mie singularity antibody belongs under the category of this field, and the reference which has described this method of preparation is incorporated as reference as a whole here.

[0059] Preparation of an antibody with the singularity of 3 called the Mie singularity antibody suitable for replying to the fundamental problem of this invention may be carried out with the gestalt of a "single chain adjustable fragment" (scFv) by joining the third antigen binding site which has another singularity in one of the H chains of IgG of a bispecific antibody. scFv is :-S-S(G4S) nD-I combined through the linker of the following [one] of an H chain. Linker (S= serine, G= glycine, D= aspartic acid, I= isoleucine).

[0060] It is similar, Mie singularity F(ab)2 structure is prepared by permuting CH2-CH3 field of the H chain of the one singularity of a bispecific antibody by scFv of the third singularity, and CH2-CH3 field of the H chain of other singularity is removed by recombination of the same kind etc. by installation of the stop codon into a code gene by one side (at end of a "hinge" field).

[(Refer to drawing 5) 0061] It is also possible to prepare a Mie singularity scFv structure. In this case, the VH-VL field of 3 showing the singularity from which 3 differs is put in a row and put in order (drawing 6).

[0062] A perfect bispecific antibody may be used according to this invention. A perfect bispecific antibody is the combination of the antibody one half child (one immunoglobulin H chain and an L chain respectively) of 2 who expresses one singularity like the usual antibody, respectively, and has Fc part which shows the effector function in which it was known well additionally. They are preferably prepared by KUADDO Roman law. This method of preparation is typically described by DE-A-44 19 399. This document is the purpose of a perfect indication of a bispecific antibody, and is incorporated as a whole as reference also in the viewpoint of a definition of this antibody. It may be used in the range in which other methods of preparation naturally bring about the above-mentioned bispecific antibody with perfect them needed according to this invention.

[0063] For example, by the producing method (6) developed newly, a perfect bispecific antibody may be prepared in sufficient amount. The combination of

the bispecific antibody of 2 minimizes the danger that the tumor cell which has discovered only one antigen will not be recognized, to the neoplasm relevance antigen (for example, c-erb-B2 like GA-733-2=C215, ep-cam) with which two differ on a breast cancer cell.

[0064] Anti-c-erb-B2 x To attain antitumor immunity nature is also tried by processing using duplex singularity F(ab')2 fragment with the singularity of anti-CD64. The main advantages of bsF(ab')2 fragment are that only a FcgammaRI+ cell is re-deflected to a neoplasm for the singularity used. While bsF(ab')2 fragment has the capacity which destroys a neoplasm directly, for themselves [these], they cannot establish antitumor immunity nature. Only a T cell with a specific T cell receptor has this capacity. While a FcgammaRI+ cell can activate a neoplasm specific T cell indirectly by presentation (minding MHC I or MHC II, respectively) of the neoplasm specific peptide which follows the phagocytosis of for example, a neoplasm constituent, the effect of induction of an antitumor immunity system is not so high in this case (it has set to 30% of the patient, and is a chisel).

[0065] The further advantage of perfect bsab which can re-deflect a T cell as compared with bsF(ab')2 above-mentioned fragment is : 1. described below. In perfect bsab, it is combinable with an Fc receptor positive cell, and it can contribute to destruction of a neoplasm directly by one side, and by ADCC (antibody dependency cell mediation sexual cell toxicity (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)), as mentioned above on the other hand, it can contribute to T cell activation directly..

2. Turn an anergy nature neoplasm specific T cell to the tumor cell which may be directly reactivated by the neoplasm according to this invention according to the perfect T cell re-deviation bsab. this -- anti- -- CD64x It must have been finished using bsF(ab')2 fragment with the singularity of an antitumor relevance antigen. 3. Anti-CD64 x While it was only that bsF(ab')2 fragment with the singularity of an antitumor relevance antigen can only finish antitumor immunity nature by 30% of the patient, according to this invention, the prevention in 100% of an animal might be finished in the experiment by the mouse using perfect bsab of a T cell re-deviation.

[0066] Association of bsab to Fc gamma-RI is : (1) which has the important advantage of 2 in the viewpoint of the optimal antitumor effectiveness. Probably, the Fcgamma-positive cell has contributed to the antitumor effectiveness of the cytotoxic T cell which can remove a tumor cell using ADCC and is turned to the tumor cell by bsab at (1) and this point interdependently (13).

(2) An Fc gamma-RI-positive cell (it is (like monocyte / macrophage / dendritic cell)) can offer the same important costimulatory signal as antigen presentation to a T cell, and can prevent anergy-ization of a T cell by it. The stimulated T cell which has the T cell receptor which recognizes a neoplasm

specific peptide (shown on a tumor cell through an MHC antigen) as a desirable by-product for a perfect bsab mediation nature interaction with the accessory cell of a T cell and a tumor cell may exist as furthermore shown in drawing 1. In this case, the costimulation needed for right activation of a T cell will be offered by the accessory cell (for example, monocyte). At this point, the antibody of this invention except direct T cell receptor non-dependency bsab mediation nature neoplasm destruction (drawing 1 A) will also surely activate and produce the neoplasm specific T cell (drawing 1 B) which continues a patrol within the after [decomposition] patient of bsab. that is, by perfect bsab (for example, the inside of a tumor cell -- incorporation of a costimulatory antigen like B-7), the neoplasm tolerance in a patient can be overcome like gene therapy-approach.

[0067] With this point, upper accommodation of the manifestation of Fc gamma-RI is succeedingly carried out in each one of cells at a G-CSF therapy.

[0068] Description will be carried out [above-mentioned] and this invention will especially be described below in respect of the bispecific antibody. Of course, the Mie singularity antibody may also be used instead of a bispecific antibody in the range equipped with the preparation with which they were made.

[0069]

[Embodiment of the Invention]

immunization (short-term incubation) 1. in the immunization protocol ex vivo preparation of the single cell suspension (10^7 - 10^9 cell) of the self-neoplasm matter (or self-tumor cell same neoplasm type) origin -- and -- succeedingly -- gamma ray exposure (50 to 100 Gy).

2. It is addition of bsab (5-50microg), and 4 degrees C, and is an incubation for 45 minutes. It is the washout of an uncombined antibody after that.

3. Regrouting of cell mixture (i. v.).

[0070] preparation of the single cell suspension (10^7 - 10^9 cell) of the immunization (long-term incubation) 1. self-neoplasm matter (or self-tumor cell same neoplasm type) origin in ex vivo -- and -- succeedingly -- a gamma ray exposure (50 to 100 Gy).

2. Addition of bsab (5-50microg), incubation for 45 minutes.

3. Addition of PBMC (10^8 - 10^{10}) [1×10^9 cell instead obtained from :T cell AFERESHISU (aphaeresis)],

4. Act as the monitor of the T cell reactivity by transfer of an amount to self-breast cancer cell lineage (MCF-7, MX-1) etc. five to seven days after.

5. Regrouting (I. V.) (in Case of T-Cell AFERESHISU: Frozen Preservation)

Abbreviation of PBMC Cultivated from the 4th within Patient in the 14th Day :P BMC and Peripheral Blood Liquid Mononuclear Cell;I.V., Intravenous [0071]

Although it is the same assay, depending on addition of cytokine, the main

effectiveness of immunization by this ex vivo in the animal model is instead shown by the assay carried out using common bsab (rat IgG2B x there is no activation of the accessory cell by bsab of the subclass combination of a rat IgG 1) (5).

[0072] The advantage of the approach indicated by this and the contrast target here consists in "self-satisfaction" ("self-sufficiency") about the cytokine (it is (like INF-alpha or TNF-alpha)) needed for upper accommodation of MHC1 on a tumor cell by activation of the coincidence of the T cell to a tumor cell, and a accessory cell (monocyte/macrophage, drawing). This is finished with the specific subclass combination mentioned at the beginning of perfect bsab used here. In the case of a short-term incubation, these processes are produced within a patient. The further advantage of a short-term incubation is in the following points. (i) Avoid cultivating cell suspension using the blood serum content culture medium needed by another approach. (ii) The culture which a price requires according to GMP accommodation for this reason is also avoidable. (iii) A still more important field is being able to avoid the side effect by bsab which may happen, respectively, or being able to decrease, since there are few amounts of the antibody applied intentionally.

[0073] The advantage in a long-term incubation is that, as for bsab in in vitro, after [for several terms] itself disappears (and so, this approach may be established as a "medical supply", although not established as "physic").

[0074]

[Example]

Dissolution H-Lac78 of the tumor cell of the bispecific antibody mediation nature by the example 1 self-T cell is cell lineage which was established from the hypopharynx gun and has discovered epcam with a high level (itself FACS data). Production of a self-cytotoxic T lymphocyte was detectable using the peripheral mononuclear cell (PBMC) obtained from H-Lac78 and a volunteer. H-Lac78 (2x10⁴) of a constant rate was incubated with PBMC of various amounts under existence of bsab (anti-Epcam x anti-CD-3) or un-existing (10ng) for this purpose. The seven-day back PBMC was removed and it analyzed by flow cytometry. The number of H-Lac78 tumor cells was detected to coincidence. activation of a T cell -- formation of a cluster --; observable under a microscope -- growth is proved by incorporation of radio label thymidine -- I will come out. Detection of the remaining tumor cells is carried out under a microscope in a peripheral blood liquid cell like what is depended on the epithelium marker epcam which is not discovered. As shown in drawing 2, H-Lac78 cell was completely dissolved under existence of bsab, namely, the epcam positive cell was not detected by the flow cytometry of seven days after. These data were checked by microscope observation. By contrast, under un-existing [of bsab], the confluent layer of H-Lac78 cell

was observed in the well, and FACS was able to detect the epcam positive cell.

[0075] the activation self by transfer experiment -- in the detection length *** transfer experiment of CTL, PBMC which incubated under existence of bsab or un-existing, respectively was transferred on H-Lac78 cell having no re-addition of bsab, and new. Even in this case, although the tumor cell was dissolved, it was going too far by PBMC activated by bsab before. The dissolution of H-Lac78 was perfect within 24 hours to the rate of PBMC of 2 for H-Lac78 cell of 1. the addition of interleukin-2 (IL-2) with this external result -- there is nothing -- self -- it is shown that CTL is produced. Since IL-2 are indispensable to activation of a T lymphocyte, the data obtained here suggest that IL-2 are produced by bsab mediation nature activation by the T cell itself. Being able to check induction of IL-2mRNA by addition of bsab by subsequent RT-PCR, bsab was more clearly [than the original start antibody] excellent there (drawing 3). Since IL-2 are described as antitumor effective cytokine, as for this observation, in that limitation, administration of the whole body of IL-2 is important; however suitable concentration has a limitation for that toxicity. By contrast, since IL-2 are guided by perfect bsab, for example, cytotoxic risk does not appear in local production of IL-2. Moreover, since effective induction of IL-2 (and IL-12) needs a stimulus of a T cell through a T cell receptor and CD28, this shows the importance of the Fc receptor positive cell in the T cell activation by perfect bsab (on conditions of the ligand of CD28, CD80, and CD86).

[0076] In order to reply to the problem whether example 2 bispecific antibody can guide long-term continuation antitumor immunity nature, affiliated B16 tumor cell of 5×10^3 was used, and it injected with C57BL/6 mouse first. a two days after group -- it processed using perfect bsab which prepares a mouse (18 animals) by KUADDO Roman law, and recognizes the target structure on a tumor cell (ep-cam/C215= neoplasm relevance antigen) like CD3 on a T cell. The second group (six animals) received a mol of a Fab fragment, such as having the singularity of both which are contained only in bsab. Or all the animals of a Fab control group died in less than 56 days, while it had to be made the sacrifice, 14 survived among the animals of 18 processed using bsab. Although injected with the animal of surviving 14 with another dose of 750b16 tumor cell 144 days after injection of the first of a tumor cell, there was no administration of bsab at this time. The non-processing animal of 5 was medicated with the tumor cell of the same number as control. While the animal of a non-processing control group's last had to be made into the 66 days after sacrifice of neoplasm injection, all the animals processed by bsab survived (monitor period: 120 days which will follow the second tumor cell injection). The survival graph of an experiment with which 2 by which drawing 4 A and B was also referred to : mentioned

above continues.

[0077] Bibliography 1.Haagen etc. and Interaction of human monocyte Fcgamma receptors with rat IgG2b, J. Immunolog. and 1995, 154 : 1852-18602.Gast G. C., Haagen I.-A., and van Houten A.A., Klein S., and Duits A. J., de Wager R.A., and Vroom T. M., Clark M.R., J.Phillips, van Dijk A.J.G., de Lau W.B.M., and BastB.J.E.G.CD8 T-cell activation after intravenous administration of CE3 XCD19 bispecific antibody in patients with non-Hodgkin lymphoma.CancerImmunol., Immunother.40 : 390, 19953.Tenny, C., Jacobs, S., Stoller, R., Earle, M. and Kirkwood, and J. Adoptive cellular immunotherapy with high-dose chemotherapy and autologous bone marrowrescue (ABMR) for recurrent breast cancer . (meeting abstract) Proc Annu.Meet.Am.Soc.Clin.Oncol; 11 : A88, 1992 ISSN: 0736-7589.CO: PKAODO-7589CO and 1993.4.Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, and cytotoxic or immune therapy- 133 randomised trialsinvolving 31 000 recurrences and 24 000 deaths among 75 000 women.Part II Lancet 339 : 71-85, 19925.Guo, etc., Effective tumor vaccines generated by in vitro modification oftumor cells with cytokins and bispecificmonoclonal antibodies.NatureMedicine 3 : 451, 19976.Lindhofer, etc., Preferential species-restricted heavy-light chain pairingin rat-mouse quadromas: Implications for a single step purification ofbispecific antibodies, J.Immunology 1995, 155:2197.Bruggemann, etc. and A MATCHED SET OF RAT/MOUSE CHIMERIC ANTIBODIES: Identification and Biological Properties of RAT H CHAIN CONSTANT REGIONS mu, gamma 1, gamma2a, gamma2b, epsilon, and andalpha1, J.Immunology 1989, 142:31458.Routledge etc., A humanized monovalent CD3 antibody which can activate homologous complement and Eur.J. Immunology 1991 and 21:27179. Greenwood etc. and Structural motifs involved in humen IgG antibody effector functions, Eur.J.Immunology 1993, 23:109810.Kardinal, etc. and Genetic atability of gene targeted immunoglobulin loci.I.Heavy chain isotype exchange inducedby a universal gene replacementvector, J.Immunology 1996, 89:30911.Kardinal, etc. and Integration vectors for antibody chimerization by homologous recombination in hybridoma cells, Eur.J.Immunology 1995, 25:792

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and NCIPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. *** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DESCRIPTION OF DRAWINGS

[Brief Description of the Drawings]

[Drawing 1] It is drawing showing the role of the accessory cell in the tumor immunity therapy using a bispecific antibody.

[Drawing 2] It is the graph which shows destruction of the tumor cell which follows administration of the bispecific antibody proved by flow cytometry.

[Drawing 3] Although it is possible at a perfect bispecific antibody, it is drawing showing impossible cytokine induction by the partial antibody.

[Drawing 4] It is the graph which shows the effect of an approach of having followed this invention in vivo.

[Drawing 5] It is drawing showing Mie singularity F(ab)2 antibody.

[Drawing 6] It is drawing showing a Mie singularity scFv antibody.

[Translation done.]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-71288

(43)公開日 平成11年(1999)3月16日

(51)Int.Cl.⁶

A 61 K 35/12
39/395
C 12 N 15/09

識別記号

ADU

F I

A 61 K 35/12
39/395
C 12 N 15/00

ADU

A

審査請求 未請求 請求項の数26 OL (全 13 頁)

(21)出願番号 特願平10-170389

(22)出願日 平成10年(1998)6月17日

(31)優先権主張番号 197 25 586. 8

(32)優先日 1997年6月17日

(33)優先権主張国 ドイツ (DE)

(71)出願人 597112966

ゲースエフ・フォルスシュングスツェン
トルム・フューア・ウンベルト・ウント・
ゲスウントハイト・ゲーエムベーハー
ドイツ・D-85764・オーバーシュライス
ハイム・インゴルシュテッター・ラントシ
ュトラーゼ・1

(72)発明者 ホルスト・リントホーファー
ドイツ・D-82194・グレーベンツェル・
ビルゼンゼーヴェーク・4

(74)代理人 弁理士 志賀 正武 (外9名)

最終頁に続く

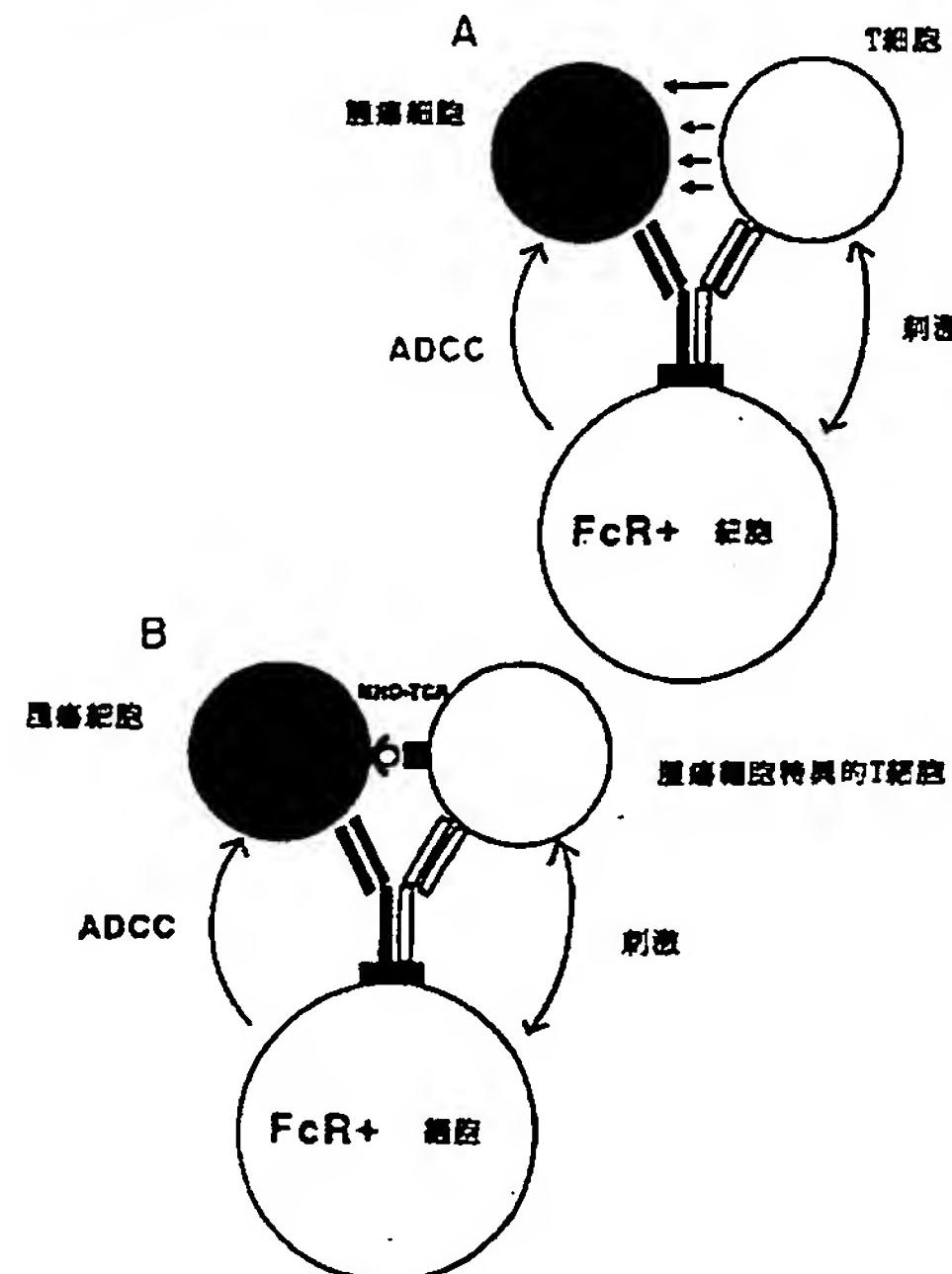
(54)【発明の名称】 異種完全二重特異性及び/または三重特異性抗体を用いたex vivo免疫化の方法

(57)【要約】

【課題】 新たなヒトにおける悪性疾患の治療法、特に抗腫瘍免疫系を成し遂げることを目標としたものを提供することが本発明の課題である。

【解決手段】 本発明は、異種で完全な二重特異性抗体及び/または三重特異性抗体を用いたex vivo免疫化の方法に関し、同様に腫瘍性疾患の予防及び治療における、そして特に抗腫瘍免疫の誘導における上記方法の使用に関する。

二重特異性抗体を用いた腫瘍免疫療法におけるアクセサリー細胞の役割



【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の工程:

- a) 自己腫瘍細胞を単離すること;
- b) 再注入に引き続くその生存を避けるために、該腫瘍細胞を処理すること;
- c) 該処理された腫瘍細胞を、以下の性質を示す完全な異種の二重特異性及び/三重特異性抗体とインキュベートすること:
 α-T細胞に結合する;
 β-腫瘍細胞上の少なくとも一つの抗原と結合する;
 γ-Fc受容体ポジティブ細胞と(二重特異性抗体の場合には)そのFc部分で、または(三重特異性抗体の場合には)第三の特異性で結合すること;を含むヒト及び動物のex vivoでの免疫化法。

【請求項2】 上記抗体が、Fcγ受容体I, II, またはIIIを持つFc受容体ポジティブ細胞に結合できるように選択されることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項3】 上記抗体が、单球、マクロファージ、樹状細胞、「ナチュラルキラー」細胞(NK細胞)及び/またはFc γ 受容体Iポジティブ細胞である活性化された好中球に結合できることを特徴とする請求項2記載の方法。

【請求項4】 上記抗体が腫瘍反応性相補的結合抗体を誘導でき、そのため体液性免疫応答を誘導できることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項5】 上記抗体がCD2, CD3, CD4, CD5, CD6, CD8, CD28及び/またはCD44を介してT細胞と結合するように選択されることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項6】 上記抗体が、そのFc受容体ポジティブ細胞への結合に引き続いて、共刺激抗原としてCD40, CD80, CD86, ICAM-1及び/またはLFA-3の発現、及び/またはFc受容体ポジティブ細胞によるサイトカインの分泌を始めるまたは増大するように選択されることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項7】 上記抗体がサイトカインであるIL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12の分泌を、及び/またはTNF- α の分泌を増大するように選択されることを特徴とする請求項6記載の方法。

【請求項8】 上記二重特異性抗体が抗CD3 × 抗腫瘍関連性抗原抗体、及び/または抗CD4 × 抗腫瘍関連性抗原抗体、及び/または抗CD5 × 抗腫瘍関連性抗原抗体、及び/または抗CD6 × 抗腫瘍関連性抗原抗体、及び/または抗CD8 × 抗腫瘍関連性抗原抗体、及び/または抗CD2 × 抗腫瘍関連性抗原抗体、及び/または抗CD28 × 抗腫瘍関連性抗原抗体、及び/または抗CD44 × 抗腫瘍関連性抗原抗体であるように選択されることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項9】 上記二重特異性抗体が以下のイソタイプのコンビネーション:ラット-IgG2b/マウス-IgG2a, ラット-IgG2b/マウス-IgG2b, ラット-IgG2b/マウス-IgG3; ラット-IgG2b/ヒト-IgG1, ラット-IgG2b/ヒト-IgG2, ラット

-IgG2b/ヒト-IgG3[東洋のアロタイプ G3m(st)=プロテインAに結合], ラット-IgG2b/ヒト-IgG4; ラット-IgG2b/ラット-IgG2c; マウス-IgG2a/ヒト-IgG3[白色人種のアロタイプ G3m(b+q)=プロテインAに結合しない、以下ではとして示される]

マウス-IgG2a/マウス-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG1-[ヒンジ]-ヒト-IgG3-[CH2-CH3]

マウス-IgG2a/ラット-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG1-[ヒンジ]-ヒト-IgG3-[CH2-CH3]

10 マウス-IgG2a/ヒト-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG1-[ヒンジ]-ヒト-IgG3-[CH2-CH3]

マウス-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG1/ラット-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG1-[ヒンジ]-ヒト-IgG3-[CH2-CH3]

マウス-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG4/ラット-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG4-[ヒンジ]-ヒト-IgG4[CH2のN末端領域]-ヒト-IgG3-[CH2のC末端領域:>アミノ酸251位]-ヒト-IgG3-[CH3]

ラット-IgG2b/マウス-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG1-[ヒンジ]-CH2-CH3]

20 ラット-IgG2b/マウス-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG2-[ヒンジ]-CH2-CH3]

ラット-IgG2b/マウス-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG3-[ヒンジ]-CH2-CH3、東洋のアロタイプ]

ラット-IgG2b/マウス-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG4-[ヒンジ]-CH2-CH3]

ヒト-IgG1/ヒト-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG1-[ヒンジ]-ヒト-IgG3-[CH2-CH3]

ヒト-IgG1/ラット-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG1-[ヒンジ]-ヒト-IgG4[CH2のN末端領域]-ヒト-IgG3-[CH2のC末端領域:>アミノ酸251位]-ヒト-IgG3-[CH3]

30 ヒト-IgG1/マウス-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG1-[ヒンジ]-ヒト-IgG4[CH2のN末端領域]-ヒト-IgG3-[CH2のC末端領域:>アミノ酸251位]-ヒト-IgG3-[CH3]

ヒト-IgG1/ラット-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG1-[ヒンジ]-ヒト-IgG2[CH2のN末端領域]-ヒト-IgG3-[CH2のC末端領域:>アミノ酸251位]-ヒト-IgG3-[CH3]

ヒト-IgG1/マウス-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG1-[ヒンジ]-ヒト-IgG2[CH2のN末端領域]-ヒト-IgG3-[CH2のC末端領域:>アミノ酸251位]-ヒト-IgG3-[CH3]

40 ヒト-IgG1/ラット-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG1-[ヒンジ]-ヒト-IgG3-[CH2-CH3]

ヒト-IgG1/マウス-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG1-[ヒンジ]-ヒト-IgG3-[CH2-CH3]

ヒト-IgG2/ヒト-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG2-[ヒンジ]-ヒト-IgG3-[CH2-CH3]

ヒト-IgG4/ヒト-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG4-[ヒンジ]-ヒト-IgG3-[CH2-CH3]

ヒト-IgG4/ヒト-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG4-[ヒンジ]-ヒト-IgG4[CH2のN末端領域]-ヒト-IgG3-[CH2のC末端領域:>アミノ酸251位]-ヒト-IgG3-[CH3]

50

3

マウス-IgG2b/ラット-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG1-[ヒンジ]-ヒト-IgG3-[CH2-CH3]

マウス-IgG2b/ヒト-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG1-[ヒンジ]-ヒト-IgG3-[CH2-CH3]

マウス-IgG2b/マウス-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG1-[ヒンジ]-ヒト-IgG3-[CH2-CH3]

マウス-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG4/ラット-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG4-[ヒンジ]-ヒト-IgG4-[CH2]-ヒト-IgG3-[CH3]

ヒト-IgG1/ラット-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG1-[ヒンジ]-ヒト-IgG4-[CH2]-ヒト-IgG3-[CH3]

ヒト-IgG1/マウス-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG1-[ヒンジ]-ヒト-IgG4-[CH2]-ヒト-IgG3-[CH3]

ヒト-IgG4/ヒト-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG4-[ヒンジ]-ヒト-IgG4-[CH2]-ヒト-IgG3-[CH3]

の一つ以上から選択されることを特徴とする請求項1から8項のいずれか一項記載の方法。

【請求項10】 上記二重特異性抗体が異種ラット/マウス二重特異性抗体から選択されることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項11】 上記三重特異性抗体がT細胞結合腕、腫瘍細胞結合腕及びFc受容体ポジティブ細胞に対する結合のための第三の特異性をもつことを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項12】 上記三重特異性抗体が抗CD3 × 抗腫瘍関連性抗原抗体、及び/または抗CD4 × 抗腫瘍関連性抗原抗体、及び/または抗CD5 × 抗腫瘍関連性抗原抗体、及び/または抗CD6 × 抗腫瘍関連性抗原抗体、及び/または抗CD8 × 抗腫瘍関連性抗原抗体、及び/または抗CD2 × 抗腫瘍関連性抗原抗体、及び/または抗CD28 × 抗腫瘍関連性抗原抗体、及び/または抗CD44 × 抗腫瘍関連性抗原抗体であるように選択されることを特徴とする請求項11記載の方法。

【請求項13】 上記工程c)において、腫瘍細胞を完全な異種二重特異性及び/または三重特異性抗体とインキュベーションした後に、抗体でチャージされた腫瘍細胞を再注入のために調製する(短期的インキュベーション)ことを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項14】 上記工程c)において、抗体との腫瘍細胞のインキュベーションを末梢血液の単核細胞(PBMC=末梢血液単核細胞)と共に実施する、または抗体との腫瘍細胞のインキュベーションの後単核細胞を加え、そしてインキュベーションを継続する(長期的インキュベーション)ことを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項15】 上記腫瘍細胞が10分から5時間の期間抗体とインキュベートされることを特徴とする請求項13または14項記載の方法。

【請求項16】 上記腫瘍細胞が15分から120分の期間抗体とインキュベートされることを特徴とする請求項13または14項記載の方法。

4

【請求項17】 上記単核末梢血液細胞が、腫瘍細胞及び抗体と1から14日間の期間インキュベートされることを特徴とする請求項14記載の方法。

【請求項18】 上記単核末梢血液細胞が約 10^9 から 10^{10} 細胞の量で加えられることを特徴とする請求項14記載の方法。

【請求項19】 上記腫瘍細胞が 10^7 から 10^9 細胞の量で加えられることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項20】 上記二重特異性及び/または三重特異性抗体が2から $100\mu g$ の量で加えられることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項21】 上記工程bにおける腫瘍細胞の処理が、放射線照射によって実施されることを特徴とする請求項1記載の方法。

【請求項22】 上記二重特異性及び/または三重特異性抗体がFc受容体ポジティブ細胞を活性化することができ、それによってサイトカインの発現及び/または共刺激抗原が誘導または増大されることを特徴とする請求項1記載の方法。

20 【請求項23】 腫瘍性疾患の予防及び治療における請求項1または14記載の調製物を含む腫瘍細胞の使用。

【請求項24】 抗腫瘍免疫性を誘導するための請求項23記載の使用。

【請求項25】 その自己腫瘍細胞が得られている患者または動物内に再注入するための異種二重特異性及び/または三重特異性抗体を用いて治療された自己腫瘍細胞の調製における請求項1記載の方法。

【請求項26】 請求項1または14の方法によって得られた腫瘍細胞調製物を含む製薬学的組成物。

30 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、異種で完全な二重特異性抗体及び/または三重特異性抗体を用いたex vivo免疫化の方法に関し、同様に腫瘍性疾患の予防及び治療における、そして特に抗腫瘍免疫の誘導における上記方法の産物の使用に関する。

【0002】 ここ数年間に成し遂げられた化学療法及び放射線療法における進歩にもかかわらず、例えば進んだ乳ガンといったヒトにおける悪性の疾患は未だ非常に好ましくない予測しか可能でない。一般的に該疾患は治癒することは不可能である。それゆえ新たな治療ストラテジーを開発する必要がある。この観点においては、腫瘍を拒絶する患者の免疫系を誘導するために用いられる免疫治療アプローチに大きな期待が置かれている。腫瘍関連性抗原が腫瘍細胞上に存在し、特に免疫系がこれらの抗原をよく認識でき悪性細胞を攻撃できることはよく知られている。しかしながら腫瘍はそれらが免疫応答を避けることを可能にする様々なストラテジーを発展させている。該細胞は例えば腫瘍関連性抗原の不十分な提示によって、及び/または一般的に存在する腫瘍特異的T細胞

の不十分な活性化によってこれを成し遂げている。

【0003】年当たり約43,000の新たなケースと共に、乳ガンはドイツにおける女性のガンの統計の最大の位置を占めている。診断時にリンパ節障害に苦しんでいる女性の3分の1より小さい数のみが、再発なく10年間生存する。

【0004】

【従来の技術】今までのところ、乳ガンに向けられた免疫治療的アプローチは、BCGまたはレバミソールによる治療のような非特異的刺激に対する方法に制限されており、そしてIL-2を用いたLAK細胞及びNK細胞の使用に制限されている(3,4)。しかしながら用いられる免疫治療のタイプは生命の延長に対していかなる証拠も提供していない;BCGによる治療はかえって不都合であるとする証明さえ存在する(3)。細胞の非特異的活性化は他のタイプの腫瘍においても大変効果的であるため、特異的免疫応答の誘導に向けた試みが為されている。

【0005】例えばT細胞再偏向性二重特異性抗体が腫瘍の治療において用いられた。これらの抗体はその結合腕の一つでT細胞受容体複合体を結合し、他の腕で腫瘍細胞上の腫瘍関連性抗原を結合する。結果として生じたT細胞の活性化及び腫瘍細胞の場所的近接化は、それぞれアポトーシスの誘導によってまたはTNF- α あるいはバーフォリンのようなサイトカインによって腫瘍細胞の破壊を導く。

【0006】公知の技術において腫瘍治療で用いられる抗体は、直接的に患者内に注入されていた。このタイプの方法はいくつかの以下の欠点を示す:

- それは高投与量の抗体を必要とする;
- ひどい副作用が生じる可能性がある;
- その腫瘍結合腕によって、抗体はin vivoでの適用の間通常組織にも結合する可能性がある。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】新たなヒトにおける悪性疾患の治療法、特に抗腫瘍免疫系を成し遂げることを目標としたものを提供することが本発明の目的である。

【0008】本発明にしたがってこの目的は請求項1により詳細に特性指摘されている方法によって成し遂げられる。本方法の好ましい実施態様は従属請求項から明白になる。

【0009】本発明の方法の最終産物は抗体を含む腫瘍細胞調製物である。この腫瘍細胞調製物を抗腫瘍免疫性を誘導することによって腫瘍性疾患の予防及び治療において用いる。

【0010】本発明の方法を用いることによって、自己腫瘍細胞が異種二重特異性及び/または三重特異性抗体を用いて治療され、本方法によって得られた腫瘍細胞調製物はその自己腫瘍細胞が得られている患者または動物内に再注入されるために用いられる。

【0011】さらに本発明は腫瘍性疾患の予防及び治療

における、特に抗腫瘍免疫系および特に好ましくは長期的免疫系の達成における本発明にしたがって提供される方法及び腫瘍細胞調製物の使用に関する。

【0012】本発明、特に実施例2において提供される実験により、長期継続腫瘍免疫性が提供されることが示される。マウスにおいて実施された実験の結果は、ヒトにも移し替えることが可能である。数年という長期的免疫性が本発明を用いることによって提供され得ることが期待される。本発明に記述されているような腫瘍細胞は、一つ以上のミューテーションによってその通常機能を欠失し、またはその通常機能が変化している全ての細胞である。これらのミューテーションのため、腫瘍細胞は非コントロール方式で増殖可能である。

【0013】本発明にしたがった腫瘍免疫性は、自己腫瘍の長期的または永続的でさえある破壊及び/またはコントロールが達成される方法のような、自己腫瘍に対する生物の体の免疫系を活性化することによって定義される。

【0014】本発明にしたがって、上記与えられた定義の下にある全ての種類の腫瘍は、本方法によって治療され得る。特に上皮腫瘍、腺ガン、結腸ガン、乳ガン、卵巣ガン、肺、喉、鼻及び耳の各ガンが治療され得る。さらに好ましくは白血病及びリンパ球のような非上皮腫瘍、及び肝腫瘍のようなウイルス誘発性の腫瘍が治療され得る。

【0015】本発明にしたがって、異種完全二重特異性抗体及び/または三重特異性抗体が用いられる。これらの抗体は患者から前もって得られる腫瘍細胞(自己腫瘍細胞)を用いてex vivoで接触される。引き続く再注入において腫瘍細胞の生存を防止するため、腫瘍細胞は抗体と接触する前に放射線照射のような本質的に既知である方法において処理される。放射線照射に引き続いて腫瘍細胞は完全異種二重特異性抗体及び/または三重特異性抗体と共にインキュベートされる。本発明にしたがって、全ての抗体が用いられるわけではなく、完全である、すなわち機能的Fc部分を持つ抗体のみが使用され、それらは天然において異種である、すなわち異なるクラス(サブクラスコンビネーション、断片もまた)及び/または起源(種)の免疫グロブリンH鎖より成るような抗体でなければならない。

【0016】これらの完全異種二重特異性及び/または三重特異性抗体は、以下の性質をさらに持つように選択されるであろう:

- α -T細胞に結合すること;
 - β -少なくとも一つの腫瘍細胞上の抗原に結合すること;
 - γ -そのFc部分(二重特異性抗体の場合)によって、または第三の特異性(三重特異性抗体の場合)によって、Fc受容体ポジティブ細胞に結合すること;
- 50 【0017】本発明の特に好ましい実施態様としては、

完全異種二重特異性及び/または三重特異性抗体をFc受容体ポジティブ細胞を活性化し、それによってサイトカイン及び/または共刺激抗原の発現を誘導または増大することができるよう選択する。上記抗体を含むように得られた腫瘍細胞調製物はさらなる再注入のために調製されたものである。それは例えば再注入に適した装置に移される。

【0018】三重特異性抗体の場合、Fc受容体ポジティブ細胞への結合は好ましくはFc受容体ポジティブ細胞のFc受容体を介して、またはFc受容体ポジティブ細胞(抗原提示細胞)上のマンノース受容体のような他の抗原を介しても生じる。

【0019】本発明の方法及びここで記述されている抗体の使用だけが、腫瘍細胞が以前に得られている患者内への抗体の再注入後に抗腫瘍免疫系の発展を確実にする。好ましくは再注入は原始的腫瘍の治療の後の患者で、好ましくは最小の残余の疾患(MRD)の場合の患者で実施される。ほとんど残余の腫瘍細胞を持たないが再発の高い危険をもつ患者においては、本発明にしたがって提供される方法の使用は特に効果的であろう。

【0020】本発明の方法を用いることによって、公知の技術から知られており以下により詳細に記述されている欠点を避けることが可能である。

【0021】本発明にしたがって有用な異種二重特異性抗体及び/または三重特異性抗体はある意味では本質的に既知のものであるが、別の意味ではそれらは本出願において初めて記述されるものである。bsabに対する例としては、乳ガンのような上皮腫瘍で用いられる抗CD3 × 抗epcam抗体が存在する。

【0022】本発明にしたがって、2の方法のバリエーションが区別可能である：

1. 短期的インキュベーション、及び
2. 長期的インキュベーション。

【0023】短期的インキュベーションは自己腫瘍を完全な異種二重特異性及び/または三重特異性抗体に10分から5時間の期間、または10分から3時間、またはさらに好ましくは15分から2時間の期間、さらに好ましくは15分から1時間の期間インキュベーションすることをいう。そしてこの方法で抗体とチャージされた腫瘍細胞を再注入のため調製する。

【0024】長期的インキュベーションは自己腫瘍細胞を抗体とチャージするために、約10分から5時間、好ましくは15分から2時間、そしてさらに好ましくは15分から1時間インキュベーションすることをいう。続いて患者の血液細胞、好ましくは末梢血液の単核細胞(PBMC = peripheral blood mononucleated cell)を加え、それからこの混合物を1から14日、好ましくは3から10日そしてより好ましくは6から10日といった長期的な期間インキュベートする。代わりに処置のもう一つの方法は自己腫瘍細胞を直接的に二重特異性抗体及び/または三

重特異性抗体と、そして患者の血液細胞と接触させることである。この方法では、腫瘍に対するたくさんの免疫細胞を「入れ知恵する」("priming")することがex vivoで成し遂げられる。その後これらの細胞を患者内に再注入する。長期的インキュベーションはまた抗体の内面化と分解を導く。

【0025】予備的なin vitroでの結果は、記述された方法で前処理された免疫細胞はさらに二重特異性及び/または三重特異性抗体の添加なく腫瘍細胞を破壊できる

10 (実施例1参照)。

【0026】長期的インキュベーションと同様に短期的インキュベーションでは、T細胞は腫瘍細胞上に固定化された二重特異性及び/または三重特異性抗体によって腫瘍細胞へ再偏向される;同時に二重特異性及び/または三重特異性抗体のFc部分に対するFc受容体ポジティブ細胞の結合が再注入後生じる。これは(それぞれT細胞または腫瘍細胞上に)固定化された完全な二重特異性抗体のFc部分に対する結合によって、Fc受容体ポジティブ細胞の活性化を導く。

20 【0027】免疫化の成功を増大するために、短期的インキュベーション法または長期的インキュベーション法のそれぞれにしたがった抗体を用いて処理された腫瘍細胞を、一度だけでなく適宜に数度患者に投与することが可能である。

【0028】腫瘍細胞上では細胞内プロセッシングマシンネリー(プロテアソーム複合体)と同様にMHC1の上流調節が、腫瘍細胞にすぐ近接したサイトカイン(INF-γ及びTNF-αのような)の放出のため生じる。T細胞の二重特異性抗体介在性活性化及びアクセサリー細胞のため、サイトカインが放出される(図1及び3参照)。すなわち完全なbsabによって腫瘍細胞が破壊され食作用を受けるだけではなく、その抗腫瘍免疫系もまた増大される。

30 【0029】bsabによるFc受容体ポジティブ細胞の活性化は、それぞれbsabのサブクラスまたはサブクラスコンビネーションに依存する。in vitroでの実験に示されるように、例えばマウス IgG2a/ラット IgG2bのサブクラスコンビネーションのbsabは、Fc受容体ポジティブ細胞に結合できるが(1)、これらの細胞を比較可能に活性化することは明らかにできない(2)。

40 【0030】完全なbsabは結合腕の一つ(例えばCD3またはCD2に対する)を介してT細胞に結合し活性化することができるが、bsabのFc部分に結合したFc受容体ポジティブ細胞由来の共刺激シグナルは、T細胞に伝達されるであろう。すなわちbsabの一つの結合腕を介したT細胞活性化と、T細胞へのFc受容体ポジティブ細胞由来の共刺激シグナルの同時に生じる伝達の組み合わせだけが、効果的なT細胞活性化を引き起こす(図1A)。腫瘍細胞で不十分に活性化されアネルギー性である腫瘍特異的T細胞は、本発明のex vivoでの前処理にしたがって再活性化もされるであろう(図1B)。

50

【0031】抗腫瘍免疫系の誘導におけるさらなる重要な面は、食作用、プロセッシング及びbsabにより向かえ活性化されるアクセサリー細胞(単球/マクロファージ、樹状細胞、及びNK-「ナチュラルキラー」細胞)による腫瘍構成成分の提示の可能性である。この抗原提示の古典的なメカニズムにより、CD8ポジティブ細胞と同様に腫瘍特異的CD4細胞が生産され得る。さらに腫瘍特異的CD4細胞は、T-B細胞共作用の流れにおいて体液性の免疫応答の誘導で重要な役割を演じる。

【0032】二重特異性及び三重特異性抗体は、一つの結合腕によってT細胞のT細胞受容体複合体と結合でき、第二の結合腕によって腫瘍細胞上の腫瘍関連性抗原と結合できる。それによってそれらはサイトカインを放出することによってまたはアボトーシス介在性メカニズムによって腫瘍細胞を破壊するT細胞を活性化する。さらに二重特異性抗体によるその活性化の流れの中で、それはT細胞がその受容体を介して腫瘍特異的抗原を認識することを明らかに可能にし、それによって長期継続免疫化が始まる(図1B)。この点では二重特異性または三重特異性抗体の完全なFc部分は、単球/マクロファージ及び樹状細胞のようなアクセサリー細胞への結合を介在し、これらの細胞がそれら自身細胞毒性になり及び/または同時にT細胞に対する重要な共刺激シグナルを伝達することを誘導するという点で特に重要である(図1B)。この方法でT細胞応答が、ある程度は未知の腫瘍特異的ペプチドに対しても誘導されることが可能なように思われる。

【0033】二重特異性及び/または三重特異性抗体によって腫瘍細胞に対してアネルギー化し得る腫瘍特異的T細胞の再偏向、及び二重特異性または三重特異性抗体のFc部分に結合したアクセサリー細胞による該T細胞の同時に起きる共刺激化は、細胞毒性T細胞(CTL)のアネルギーを逆転するように機能するであろう。すなわち完全な異種二重特異性及び/または三重特異性抗体を用いて、腫瘍に対して患者内に存在するT細胞対応が中和され得、それによって長期継続腫瘍免疫系が誘導され得る。

【0034】最後の面は、同系の腫瘍及び完全なbsabを用いた処理に引き続いて長期継続抗腫瘍免疫系を誘導したマウスを用いた実験からの予備的なin vivoでのデータによって支持される。これらの実験において、第一の腫瘍注射の後bsabを用いて成功して処理され得た14の動物のうち全部の14が、第一の注射の後144日でのもう一回の腫瘍注射をbsabのさらなる投与なしで生き残った(実施例2参照)。

【0035】二重特異性及び/または三重特異性抗体によるex vivoでの免疫化におけるもう一つの利点は、(i)起こり得る副作用を最小化すること、(ii)体の外で腫瘍細胞に対する腫瘍結合腕の結合をコントロールすること、そして(iii)できるだけ二重特異性及び三重特異性抗体を少なく使用することである。主として以下に詳細

が記述されているであろう方法には2の異なる方法が存在する。長期的インキュベーションに関する重要な点は、用いられる二重特異性または三重特異性抗体は計画されたインキュベーション期間の間消失し分解されることである。この方法ではこの免疫化は、冗長な薬剤改善工程を避けるであろう。

【0036】

【課題を解決するための手段】短期的及び長期的インキュベーション法において、腫瘍細胞は抗体と10分から5時間の期間以上、好ましくは3時間まで、さらに好ましくは2時間まで、またさらに好ましくは15分から1時間インキュベートされる。好ましくは該インキュベーションは4°Cから25°Cの温度で、特に好ましくは4°Cから10°Cで実施される。該インキュベーションは好ましくは中性的pHを持つバッファー生理食塩水の滅菌環境で実施される。短期的インキュベーションの場合では、患者内への再注入はその後すぐに実施される。長期的インキュベーション法においては、このブレインキュベーションに引き続いて単核末梢血液細胞を加え、さらに1から14日の期間、より好ましくは3から10日、さらに好ましくは6から10日間ブレインキュベートされた腫瘍細胞/抗体と共にインキュベートする。好ましくはこのインキュベーションはインキュベーターにおいてGMPコンディション(適切に製造された生産物(Good Manufacturing Production =GMP))の下と同様に滅菌コンディションの下で37°Cで実施される。上記記述したように長期的インキュベーションの下では、血液細胞は代わりに適したコンディションの下で腫瘍細胞及び抗体と共にインキュベートされてもよい。

【0037】上述したインキュベーションコンディションは例示としてのみ意図されている。用いられる腫瘍細胞及び抗体に依存して、他の期間、温度、コンディション等、及び一般的に異なるインキュベーションコンディションもまた用いられ得る。簡単な実験によって、当業者は該コンディションを確立することが可能であろう。

【0038】ブレインキュベーションの間腫瘍細胞は好ましくは 10^7 から 10^9 細胞の量で、さらに好ましくは約 10^8 細胞の量で用いられる。当然当業者は研究室の実験によって測定され得る異なるインキュベーションコンディションを選択できる(例えば細胞数およびインキュベーション期間の変化)。本発明の方法において用いられる二重特異性及び/または三重特異性抗体は、2から $100\mu g$ の量で、さらに好ましくは5から $70\mu g$ の量で、特に好ましくは5から $50\mu g$ の量で加えられる。

【0039】用いられる自己腫瘍細胞は例えば、腫瘍細胞のさらなる生存を避けるために放射線照射される。例えばガンマ放射線が用いられ、例えば50から100Gyの放射量で用いられる。本発明のもう一つの実施態様では、自己腫瘍細胞は化学的物質によって、例えばそのさらなる生存を避けるためマイトイシンCによって処理され

る。

【0040】本発明にしたがって用いられる抗体は、好ましくはアネルギー状態である腫瘍特異的T細胞を活性化し得る。さらにそれらは腫瘍反応性相補的結合抗体を誘導でき、それによって体液性免疫応答を誘導できる。

【0041】結合は好ましくは、CD3, CD2, CD4, CD5, CD6, CD8, CD28, 及び/またはCD44を介してT細胞と生じる。Fc受容体ポジティブ細胞は少なくともFc γ 受容体I, II, またはIIIを持っている。

【0042】本発明にしたがって用いられ得る抗体は、単球、マクロファージ、樹状細胞、「ナチュラルキラー」細胞(NK細胞)及び/またはFc γ 受容体I-ポジティブ細胞である活性化好中球に結合できる。

【0043】本発明にしたがって用いられ得る抗体は、共刺激抗原のようにCD40, CD80, CD86, ICAM-1, 及び/またはLFA-3の発現における誘導または増大を導き、及び/またはFc受容体ポジティブ細胞によるサイトカイン分泌を導く。該サイトカインは好ましくはIL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, 及び/またはTNF- α である。

【0044】T細胞への結合は好ましくはT細胞のT細胞受容体複合体を介して行われる。

【0045】本発明にしたがって用いられ得る二重特異性抗体好ましくは:抗CD3 × 抗腫瘍関連性抗原抗体及び/または抗CD4 × 抗腫瘍関連性抗原抗体及び/または抗CD5 × 抗腫瘍関連性抗原抗体及び/または抗CD6 × 抗腫瘍関連性抗原抗体及び/または抗CD8 × 抗腫瘍関連性抗原抗体及び/または抗CD2 × 抗腫瘍関連性抗原抗体及び/または抗CD28 × 抗腫瘍関連性抗原抗体及び/または抗CD44 × 抗腫瘍関連性抗原抗体である。

【0046】本発明にしたがって用いられ得る三重特異性抗体好ましくは:抗CD3 × 抗腫瘍関連性抗原抗体及び/または抗CD4 × 抗腫瘍関連性抗原抗体及び/または抗CD5 × 抗腫瘍関連性抗原抗体及び/または抗CD6 × 抗腫瘍関連性抗原抗体及び/または抗CD8 × 抗腫瘍関連性抗原抗体及び/または抗CD2 × 抗腫瘍関連性抗原抗体及び/または抗CD28 × 抗腫瘍関連性抗原抗体及び/または抗CD44 × 抗腫瘍関連性抗原抗体である。

【0047】本発明にしたがって有用な三重特異性抗体は少なくとも、T細胞結合腕、腫瘍細胞結合腕及びFc受容体ポジティブ細胞に結合する結合腕を持つ。言及された結合腕の最後のものは、抗Fc受容体結合腕またはマンノース受容体結合腕であろう。

【0048】二重特異性抗体は好ましくは異種完全ラット/マウス二重特異性抗体である。

【0049】本発明にしたがって有用な二重特異性及び三重特異性抗体によって、T細胞は活性化され腫瘍細胞に対して再偏向される。好ましくは用いられるであろう異種完全二重特異性抗体は、一つ以上の以下のイソタイプのコンビネーションから選択される:ラット-IgG2b/マ

- ウス-IgG2a, ラット-IgG2b/マウス-IgG2b, ラット-IgG2b/マウス-IgG3; ラット-IgG2b/ヒト-IgG1, ラット-IgG2b/ヒト-IgG2, ラット-IgG2b/ヒト-IgG3[東洋のアロタイプ G3m(st)=プロテインA/C結合], ラット-IgG2b/ヒト-IgG4; ラット-IgG2b/ラット-IgG2c;
- マウス-IgG2a/ヒト-IgG3[白色人種のアロタイプ G3m(b+g)=プロテインA/C結合しない、以下ではとして示される]
- マウス-IgG2a/マウス-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG1-[ヒンジ]-ヒト-IgG3-[CH2-CH3]
- マウス-IgG2a/ラット-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG1-[ヒンジ]-ヒト-IgG3-[CH2-CH3]
- マウス-IgG2a/ヒト-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG1-[ヒンジ]-ヒト-IgG3-[CH2-CH3]
- マウス-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG1/ラット-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG1-[ヒンジ]-ヒト-IgG3-[CH2-CH3]
- マウス-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG4/ラット-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG4-[ヒンジ]-ヒト-IgG4[CH2のN末端領域]-ヒト-IgG3-[CH2のC末端領域:>アミノ酸251位]-ヒト-IgG3-[CH3]
- ラット-IgG2b/マウス-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG1-[ヒンジ]-CH2-CH3]
- ラット-IgG2b/マウス-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG2-[ヒンジ-CH2-CH3]
- ラット-IgG2b/マウス-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG3-[ヒンジ-CH2-CH3、東洋のアロタイプ]
- ラット-IgG2b/マウス-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG4-[ヒンジ-CH2-CH3]
- ヒト-IgG1/ヒト-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG1-[ヒンジ]-ヒト-IgG3-[CH2-CH3]
- ヒト-IgG1/ラット-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG1-[ヒンジ]-ヒト-IgG4[CH2のN末端領域]-ヒト-IgG3-[CH2のC末端領域:>アミノ酸251位]-ヒト-IgG3-[CH3]
- ヒト-IgG1/マウス-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG1-[ヒンジ]-ヒト-IgG4[CH2のN末端領域]-ヒト-IgG3-[CH2のC末端領域:>アミノ酸251位]-ヒト-IgG3-[CH3]
- ヒト-IgG1/ラット-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG1-[ヒンジ]-ヒト-IgG2[CH2のN末端領域]-ヒト-IgG3-[CH2のC末端領域:>アミノ酸251位]-ヒト-IgG3-[CH3]
- ヒト-IgG1/マウス-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG1-[ヒンジ]-ヒト-IgG2[CH2のN末端領域]-ヒト-IgG3-[CH2のC末端領域:>アミノ酸251位]-ヒト-IgG3-[CH3]
- ヒト-IgG1/マウス-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG1-[ヒンジ]-ヒト-IgG3-[CH2-CH3]
- ヒト-IgG2/ヒト-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG2-[ヒンジ]-ヒト-IgG3-[CH2-CH3]
- ヒト-IgG4/ヒト-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG4-[ヒンジ]-ヒト-IgG3-[CH2-CH3]

ヒト-IgG4/ヒト-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG4-[ヒンジ]-ヒト-IgG4[CH2のN末端領域]-ヒト-IgG3^{*}[CH2のC末端領域:>アミノ酸251位]-ヒト-IgG3^{*}-[CH3]

マウス-IgG2b/ラット-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG1-[ヒンジ]-ヒト-IgG3^{*}-[CH2-CH3]

マウス-IgG2b/ヒト-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG1-[ヒンジ]-ヒト-IgG3^{*}-[CH2-CH3]

マウス-IgG2b/マウス-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG1-[ヒンジ]-ヒト-IgG3^{*}-[CH2-CH3]

マウス-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG4/ラット-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG4-[ヒンジ]-ヒト-IgG4-[CH2]-ヒト-IgG3^{*}-[CH3]

ヒト-IgG1/ラット-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG1-[ヒンジ]-ヒト-IgG4-[CH2]-ヒト-IgG3^{*}-[CH3]

ヒト-IgG1/マウス-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG1-[ヒンジ]-ヒト-IgG4-[CH2]-ヒト-IgG3^{*}-[CH3]

ヒト-IgG4/ヒト-[VH-CH1, VL-CL]-ヒト-IgG4-[ヒンジ]-ヒト-IgG4-[CH2]-ヒト-IgG3^{*}-[CH3]

【0050】本発明にしたがって有用な抗体は好ましくは、モノクローナル、キメラ、組換え、合成、半合成または化学的に修飾された、例えばFv, Fab, scFvまたはF(ab), 断片を持つ完全な抗体である。

【0051】好ましくはヒト起源の抗体または誘導体または断片、あるいはそれらをヒトへの応用のために適するような方法で改変した抗体(「ヒト化抗体」と呼ばれる)が用いられる(例えばShalaby等,J.Exp.Med.175(1992),217;Mocikat等,Transplantation 57(1994),405)。

【0052】上記した様々なタイプの抗体及び断片の調製は当業者に明白である。例えば好ましくヒト、ラット、マウス、ウサギまたはヤギといった哺乳動物由来のモノクローナル抗体の調製は、例えばKohler及びMilstein(Nature 256(1975),495)そしてHarlow及びLane(Antibodies,A Laboratory Manual(1988),Cold Spring Harbor)またはGalfe(Meth. Enzymol.73(1981),3)に記述されているようなありきたりの方法を用いて実施され得る。

【0053】さらに当業者に明白な技術にしたがった組換えDNA法によって、記述されている抗体を調製することが可能である(Kurucz等,J.Immunol.154(1995),4576; Hollinger等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90(1993),6444)。

【0054】本方法で用いられる抗体は過度の負担なく当業者によってデザインされ生産され得る。開示されたリファレンスのリスト、特にリファレンス(7)から(11)は、本発明に用いられる二重特異性及び三重特異性抗体を得るための方法を記述する。

【0055】特にGreenwood等の書類(9)は、適したクローニング法による単一免疫グロブリンドメイン(例えばCH2)の交換を開示する。これらのクローニング法を用いることによって例えば請求項9に記述されている新たな抗体のコンビネーションが提供され得る。例としては以下のものがある:ヒト-(VH-CH1, VL-CL)-ヒトIgG4-(ヒン

ジ)-ヒトIgG4(CH2のN末端領域)-ヒトIgG3^{*}(CH2のC末端領域:>アミノ酸251位)-ヒトIgG3^{*}(CH3)。

【0056】二重特異性抗体:ヒトIgG4/ヒト-(VH-CH1, VL-CL)-ヒトIgG4-(ヒンジ)-ヒトIgG4(CH2のN末端領域)-ヒトIgG3^{*}(CH2のC末端領域:>アミノ酸251位)-ヒトIgG3^{*}(CH3)の調製のための抗体:ヒトIgG4を用いたコンビネーションは、例えば書類(6)に記述されているような単一細胞融合によって調製される。

【0057】一方で、二重特異性抗体と呼ばれる2の異なる特異性を持つ抗体の調製は、組換えDNA法を用いて実施され得るが、もう一方ではハイブリッドハイブリドーマ融合法と呼ばれるものによっても実施され得る(例えばMilstein等,Nature 305(1993),537参照)。この方法によって、それぞれ一つの望ましい特異性を持つ抗体を生産するハイブリドーマ細胞系を融合させ、両者の特異性を持つ抗体を生産する組換え細胞系を同定し単離する。

【0058】本発明に存在する問題は、請求項1に特性指摘される性質と活性を示す限りにおいて、二重特異性及び三重特異性抗体によって解決され得る。以下に示すように2及び3の特異性を持つ抗体の調製は、詳細に記述されている。該二重特異性及び三重特異性抗体を提供することは本分野の範疇に属しており、該調製法を記述している文献は全体として参考としてここで取り込まれる。

【0059】本発明の基本的な問題に答えるのに適した三重特異性抗体と呼ばれる3の特異性を持つ抗体の調製は、例えば二重特異性抗体のIgGのH鎖の一つにもう一つの特異性を持つ第三の抗原結合部位を接合することによって、例えば「单一鎖可変断片」(scFv)の形態で実施され得る。scFvは例えばH鎖の一つに以下のリンカーを介して結合される:

-S-S(G_nS)_nD-I リンカー

(S=セリン、G=グリシン、D=アスパラギン酸、I=イソロイシン)。

【0060】類似して、三重特異性F(ab)₂構築物は二重特異性抗体の一つの特異性のH鎖のCH2-CH3領域を、第三の特異性のscFvによって置換することによって調製され、一方で例えば同種組換え等によってコード遺伝子内へのストップコドンの導入によって(「ヒンジ」領域の末端に)、他の特異性のH鎖のCH2-CH3領域は除去される。(図5参照)

【0061】三重特異性scFv構築物を調製することも可能である。この場合3の異なる特異性を表す3のVH-VL領域を連ねて並べる(図6)。

【0062】本発明にしたがって、例えば完全な二重特異性抗体が用いられる場合がある。完全な二重特異性抗体は、通常の抗体のように一つの特異性をそれぞれ表す2の抗体半分子(一つの免疫グロブリンH鎖およびL鎖のそぞれぞれ)の組み合わせで、付加的によく知られたエフェ

クター機能を示すFc部分を持つものである。好ましくはそれらはクアドローマ法によって調製される。この調製法は代表的にDE-A-44 19 399に記述されている。この書類は二重特異性抗体の完全な開示の目的で、及び該抗体の定義の観点でも参考として全体として取り込まれる。当然他の調製法もまた、それらが本発明にしたがって必要とされる上述の完全な二重特異性抗体をもたらす範囲で用いられ得る。

【0063】例えば新しく開発された生産法(6)によって、完全な二重特異性抗体は十分な量で調製され得る。乳ガン細胞上で2の異なる腫瘍関連性抗原(例えばGA-733-2=C215のようなc-erb-B2、ep-cam)に対して2の二重特異性抗体の組み合わせは、たった一つの抗原を発現している腫瘍細胞が認識されないという危険性を最小化する。

【0064】抗c-erb-B2 × 抗CD64の特異性を持つ二重特異性F(ab')2断片を用いて処理することによって抗腫瘍免疫性を達成することも試みられている。bsF(ab')2断片の主な利点は、用いられる特異性のためにFc γ RI+細胞だけが腫瘍に対して再偏向されることである。bsF(ab')2断片は腫瘍を直接的に破壊する能力を持つ一方で、それらはそれ自身では抗腫瘍免疫性を確立することはできない。特異的なT細胞受容体を持つT細胞だけがこの能力を持つ。Fc γ RI+細胞は、例えば腫瘍構成成分の食作用に引き続く腫瘍特異的ペプチドの提示によって(それぞれMHCⅠまたはMHCⅡを介して)、間接的に腫瘍特異的T細胞を活性化できる一方で、抗腫瘍免疫系の誘導の効力はこの場合それほど高くはない(患者の30%においてのみである)。

【0065】上述のbsF(ab')2断片と比較してT細胞を再偏向できる完全なbsabのさらなる利点は、以下に記述されている:

1. 完全なbsabでは、Fc受容体ポジティブ細胞に結合でき、ADCC(抗体依存性細胞介在性細胞毒性(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity))によって、一方で腫瘍の破壊に直接的に寄与し得、他方で上述したようにT細胞活性化に直接的に寄与し得る。
2. 完全なT細胞再偏向bsabによって、アネルギー性腫瘍特異的T細胞を、本発明にしたがって直接的に腫瘍で再活性化され得る腫瘍細胞に向ける。これは抗CD64 × 抗腫瘍関連性抗原の特異性を持つbsF(ab')2断片を用いて成し遂げられ得ない。
3. 抗CD64 × 抗腫瘍関連性抗原の特異性を持つbsF(ab')2断片は、単に患者の30%で抗腫瘍免疫性を成し遂げることができるのみである一方で、本発明にしたがってT細胞再偏向の完全なbsabを用いたマウスによる実験において、動物の100%における予防が成し遂げられ得た。

【0066】Fc γ -RIに対するbsabの結合は、最適の抗腫瘍有効性の観点で2の重要な利点を持つ:

- (1) Fc γ -ポジティブ細胞は、ADCCを用いて腫瘍細胞を

除去することができ(11)、この点ではbsabによって腫瘍細胞に向けられている細胞毒性T細胞の抗腫瘍効果に相互依存的に寄与しているであろう(13)。

(2) Fc γ -RI-ポジティブ細胞(単球/マクロファージ/樹状細胞のような)は、T細胞に対し抗原提示と同様な重要な共刺激シグナルを提供でき、それによってT細胞のアネルギー化を防ぐことができる。さらに図1に示されているように、T細胞のアクセサリー細胞及び腫瘍細胞との完全なbsab介在性相互作用のための望ましい副産物として、腫瘍特異的ペプチド(MHC抗原を介して腫瘍細胞上に提示される)を認識するT細胞受容体を持つ刺激されたT細胞が存在し得る。この場合T細胞の正しい活性化に必要とされる共刺激は、アクセサリー細胞(例えば単球)によって提供されるであろう。この点では直接的T細胞受容体非依存性bsab介在性腫瘍破壊(図1A)を除いた本発明の抗体は、bsabの分解後患者内でバトロールを継続する腫瘍特異的T細胞(図1B)をも活性化し生産するに違いない。すなわち遺伝子治療的アプローチと同様に完全なbsabによって(例えば腫瘍細胞内にB-7のような共刺激抗原の取り込みによって)、患者における腫瘍対応に打ち勝つことができる。

【0067】この点ではFc γ -RIの発現は、G-CSF治療に引き続いて各自の細胞で上流調節される。

【0068】本発明は上記記述され、特に二重特異性抗体の点では以下に記述されるであろう。二重特異性抗体の代わりにもちろん三重特異性抗体も、それらがなされた準備を備える範囲で用いられ得る。

- 【0069】
【発明の実施の形態】
- 30 免疫化プロトコール
ex vivoでの免疫化(短期的インキュベーション)
1. 自己腫瘍物質(または同じ腫瘍タイプの自己腫瘍細胞)由来の単一細胞懸濁液(10^7 ~ 10^9 細胞)の調製、及び引き続いてガンマ線照射(50~100Gy)。
2. bsab(5~50 μg)の添加、及び4°Cで45分のインキュベーション。その後非結合抗体の洗い流し。
3. 細胞混合物の再注入(i.v.)。
- 【0070】ex vivoでの免疫化(長期的インキュベーション)
1. 自己腫瘍物質(または同じ腫瘍タイプの自己腫瘍細胞)由来の単一細胞懸濁液(10^7 ~ 10^9 細胞)の調製、及び引き続いてガンマ線照射(50~100Gy)。
2. bsab(5~50 μg)の添加、45分のインキュベーション。
3. PBMC(10^8 ~ 10^{10})の添加、[代わりに:T細胞アフェレシス(aphaeresis)から得た 1×10^9 細胞]。
4. 5から7日後、例えば自己乳ガン細胞系(MCF-7, MX-1)に対する等量のトランスファーによってT細胞反応性をモニターする。
5. 患者内で4日目から14日目で培養したPBMCの再注入(i.v.)
(T細胞アフェレシスの場合:冷凍保存)

省略: PBMC、末梢血液単核細胞; i.v.、静脈内

【0071】同様のアッセイだが代わりにサイトカインの添加に依存し、ありきたりのbsab(ラット IgG2B × ラット IgG1のサブクラスコンビネーションのbsabによるアクセサリー細胞の活性化のない)を用いて実施されるアッセイにより、動物モデルにおける該ex vivoでの免疫化の主要な有効性が示されている(5)。

【0072】これと対照的に、ここで開示される方法の利点は、腫瘍細胞に対するT細胞及びアクセサリー細胞(单球/マクロファージ、図)の同時の活性化によって、例えば腫瘍細胞上のMHC1の上流調節に必要とされるサイトカイン(INF- α またはTNF- α のような)についての「自己満足」("self-sufficiency")に存する。これはここで用いられる完全なbsabの初めて言及された特定のサブクラスコンビネーションによって成し遂げられる。短期的インキュベーションの場合では、これらの工程は患者内で生じる。短期的インキュベーションのさらなる利点は以下の点にある。(i) 別な方法では必要とされる血清含有培地を用いて細胞懸濁液を培養することを避けること。(ii) このためGMP調節にしたがって値段のかかる培養を避けることもできること。(iii) さらに重要な面は適用される抗体の量が有意に少ないため、bsabによる起こり得る副作用をそれぞれ避けるまたは減少することができること。

【0073】長期的インキュベーションにおける利点は、in vitroでのbsabは数期間後それ自身が消失することである(そしてそれゆえ、この方法は「医薬」としては確立されないが、「医療用具」として確立され得る)。

【0074】

【実施例】

実施例1

自己T細胞による二重特異性抗体介在性の腫瘍細胞の溶解

H-Lac78は下咽頭ガンから確立され、高レベルでepcamを発現している(それ自体FACSデータ)細胞系である。H-Lac78及びボランティアから得た末梢単核細胞(PBMC)を用いて、自己細胞毒性Tリンパ球の生産が検出可能であった。この目的のため、一定量のH-Lac78(2×10^6)をbsab(抗Epcam × 抗CD3)の存在下(10ng)または不存在下で様々な量のPBMCと共にインキュベートした。7日間後PBMCを除去し、フローサイトメトリーで分析した。同時にH-Lac78腫瘍細胞の数を検出した。T細胞の活性化はクラスターの形成により顕微鏡下で観察可能である;増殖はラジオラベルチミジンの取り込みにより証明されるであろう。残りの腫瘍細胞の検出は、末梢血液細胞では発現されない上皮マーカーepcamによるものと同様に顕微鏡下で実施する。図2に示されるように、H-Lac78細胞はbsabの存在下で完全に溶解された、すなわちepcamポジティブ細胞は7日後のフローサイトメトリーでは検出されなかった。これらのデータは顕微鏡観察によって確認され

た。対照的にbsabの不存在下ではH-Lac78細胞の融合性の層がウェル内に観察され、epcamポジティブ細胞はFACSにより検出可能であった。

【0075】トランスファー実験による活性化自己CTLの検出

引き続くトランスファー実験において、それぞれbsabの存在下または不存在下でインキュベートされたPBMCを、bsabの再添加なしで新しいH-Lac78細胞上にトランスファーした。この場合でも腫瘍細胞は溶解したが、以前にbsabにより活性化されているPBMCによってそれは極端であった。H-Lac78の溶解は1のH-Lac78細胞に対して2のPBMCの割合まで24時間以内に完全であった。この結果はインターロイキン-2(IL-2)の外的な添加なく自己CTLが生産されることを示す。IL-2はTリンパ球の活性化に必須であるので、ここで得られたデータはbsab介在性活性化によりIL-2がT細胞自身によって生産されることを示唆する。bsabの添加によるIL-2mRNAの誘導は、その後のRT-PCRにより確認でき、そこではbsabは元のスタート抗体より明らかに優れていた(図3)。IL-2は抗腫瘍有効サイトカインとして記述されているので、この観察はその限りにおいては重要である;しかし適切な濃度におけるIL-2の全身の投与はその毒性のため限界がある。対照的に、IL-2は例えば完全なbsabにより誘導されるので、細胞毒性の危険はIL-2の局所的生産では現れない。またIL-2(及びIL-12)の効果的な誘導はT細胞受容体及びCD28を介してT細胞の刺激を必要とするので、これは完全なbsabによるT細胞活性化におけるFc受容体ポジティブ細胞(CD28, CD80, 及びCD86のリガンドという条件で)の重要性を示す。

【0076】実施例2

二重特異性抗体が長期継続抗腫瘍免疫性を誘導できるかという問題に答えるために、C57BL/6マウスを 5×10^6 の同系B16腫瘍細胞を用いて初めに注射した。2日後一群のマウス(18匹)を、クアッドローマ法により調製しT細胞上のCD3と同様に腫瘍細胞上のターゲット構造(ep-cam/C215=腫瘍関連性抗原)を認識する完全bsabを用いて処理した。第二の群(6匹)はbsabのみに含まれる両方の特異性を持つ等モルのFab断片を受け取った。Fabコントロール群の動物の全てが56日以内で死んだまたは犠牲にされねばならなかった一方で、bsabを用いて処理された18の動物のうち14が生き残った。腫瘍細胞の第一の注射の14日後、生き残った14の動物は750 b16腫瘍細胞のもう一つの投与量で注射されたが、この時はbsabの投与はなかった。コントロールとして同数の腫瘍細胞を5の非処理動物に投与した。非処理コントロールグループの最後の動物が腫瘍注射の66日後犠牲にされねばならなかった一方で、bsabで処理された動物の全てが生き残った(モニター期間:第二の腫瘍細胞注射に引き続く120日)。図4A及びBも参照:上述された2の引き続く実験の生存グラフ。

[0077] 参考文献

1. Haagen等, Interaction of human monocyte Fc γ receptors with rat IgG2b, J.Immunol., 1995, 154: 1852-1860
2. Gast G.C., Haagen I.-A., van Houten A.A., Klein S., Duits A.J., de Wager R.A., Vroom T.M., Clark M.R., J. Phillips, van Dijk A.J.G., de Lau W.B.M., Bast B.J. E.G. CD8 T-cell activation after intravenous administration of CE3 XCD19 bispecific antibody in patients with non-Hodgkin lymphoma. Cancer Immunol., Immunother. 40: 390, 1995
3. Tenny, C., Jacobs, S., Stoller, R., Earle, M., 及び Kirkwood, J. Adoptive cellular immunotherapy with high-dose chemotherapy and autologous bone marrow rescue (ABMR) for recurrent breast cancer (meeting abstract). Proc Annu. Meet. Am. Soc. Clin. Oncol.; 11: A88, 1992 ISSN: 0736-7589. CO: PKAODO-7589CO, 1993.
4. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic or immune therapy - 133 randomised trials involving 31 000 recurrences and 24 000 deaths among 75 000 women. Part II Lancet 339: 71-85, 1992
5. Guo等, Effective tumor vaccines generated by in vitro modification of tumor cells with cytokines and bispecific monoclonal antibodies. Nature Medicine 3: 451, 1997
6. Lindhofer等, Preferential species-restricted heavy-light chain pairing in rat-mouse quadromas: Implications for a single step purification of bispecific antibodies. J. Immunol. 155: 219-224, 1995

- * ific antibodies, J. Immunology 1995, 155:219
 7. Bruggemann等, A MATCHED SET OF RAT/MOUSE CHIMERIC ANTIBODIES: Identification and Biological Properties of RAT H CHAIN CONSTANT REGIONS μ , γ 1, γ 2a, γ 2b, ϵ , and α^1 , J. Immunology 1989, 142:3145
 8. Routledge等, A humanized monovalent CD3 antibody which can activate homologous complement, Eur. J. Immunology 1991, 21:2717
 9. Greenwood等, Structural motifs involved in human IgG antibody effector functions, Eur. J. Immunology 1993, 23:1098
 10. Kardinal等, Genetic malleability of gene targeted immunoglobulin loci.I. Heavy chain isotype exchange induced by a universal gene replacementvector, J. Immunology 1996, 156:309
 11. Kardinal等, Integration vectors for antibody chimerization by homologous recombination in hybridoma cells, Eur. J. Immunology 1995, 25:792

【図面の簡単な説明】

【図1】二重特異性抗体を用いた腫瘍免疫治療におけるアクセサリー細胞の役割を示す図である。

【図2】フローサイトメトリーによって証明された二重特異性抗体の投与に引き続く腫瘍細胞の破壊を示すグラフである。

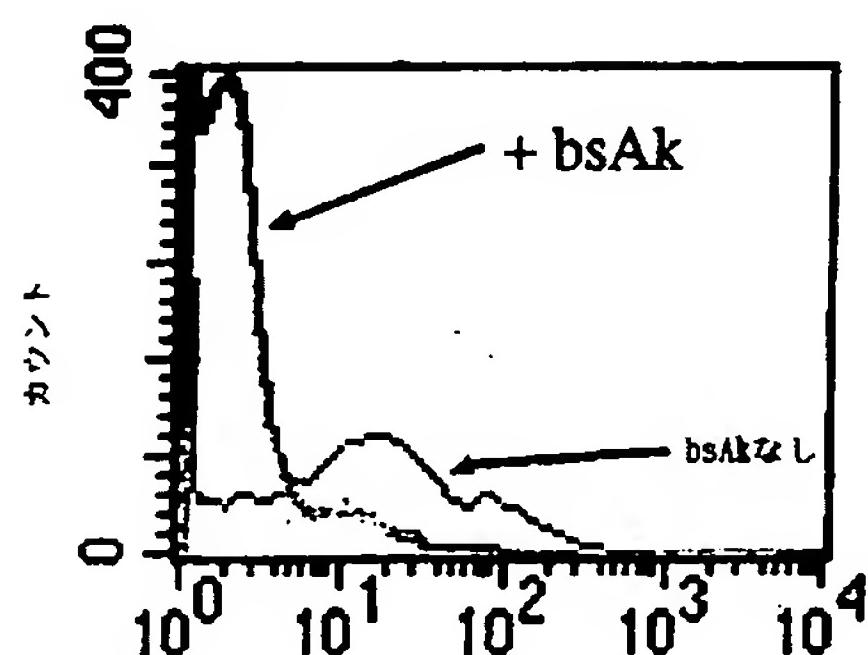
【図3】完全な二重特異性抗体で可能だが、部分的抗体では不可能なサイトカイン誘導を示す図である。

【図4】in vivoでの本発明にしたがった方法の効力を示すグラフである

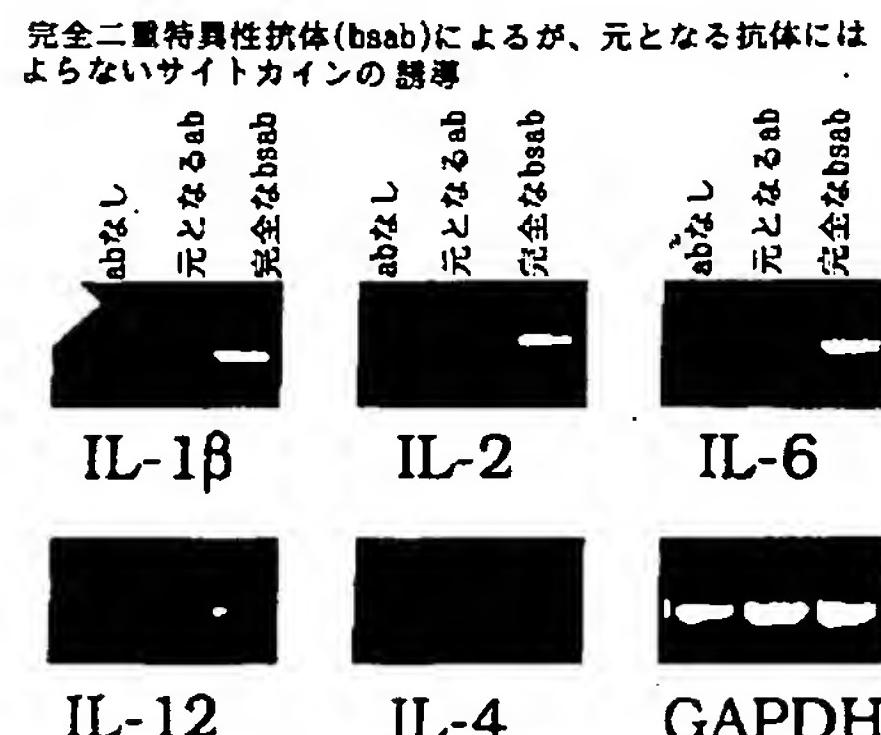
【図5】三重特異性F(ab)₂抗体を示す図である。

【図6】三重特異性scFv抗体を示す図である。

【図2】

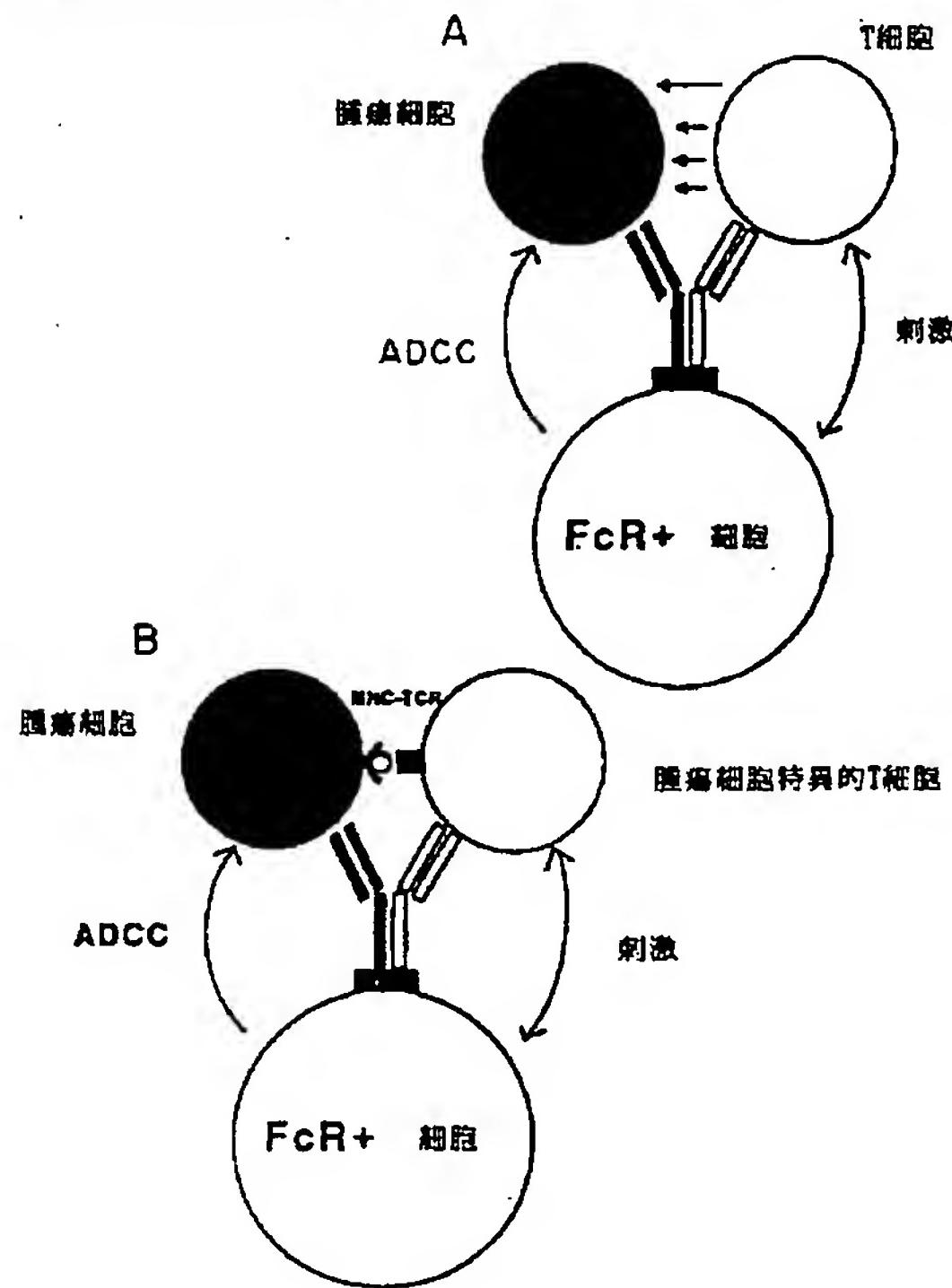


【図3】



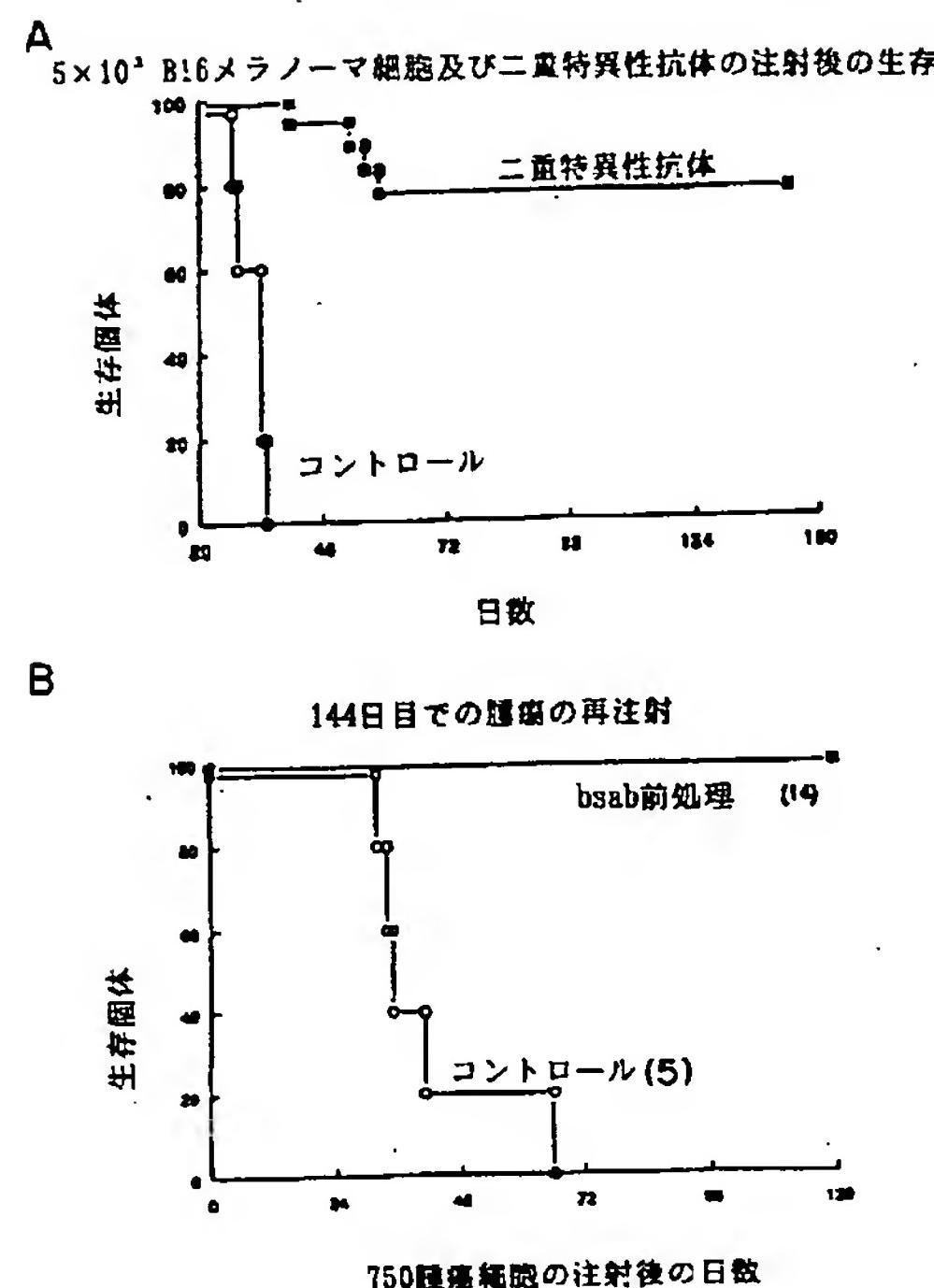
【図1】

二重特異性抗体を用いた腫瘍免疫療法におけるアクセサリー細胞の役割

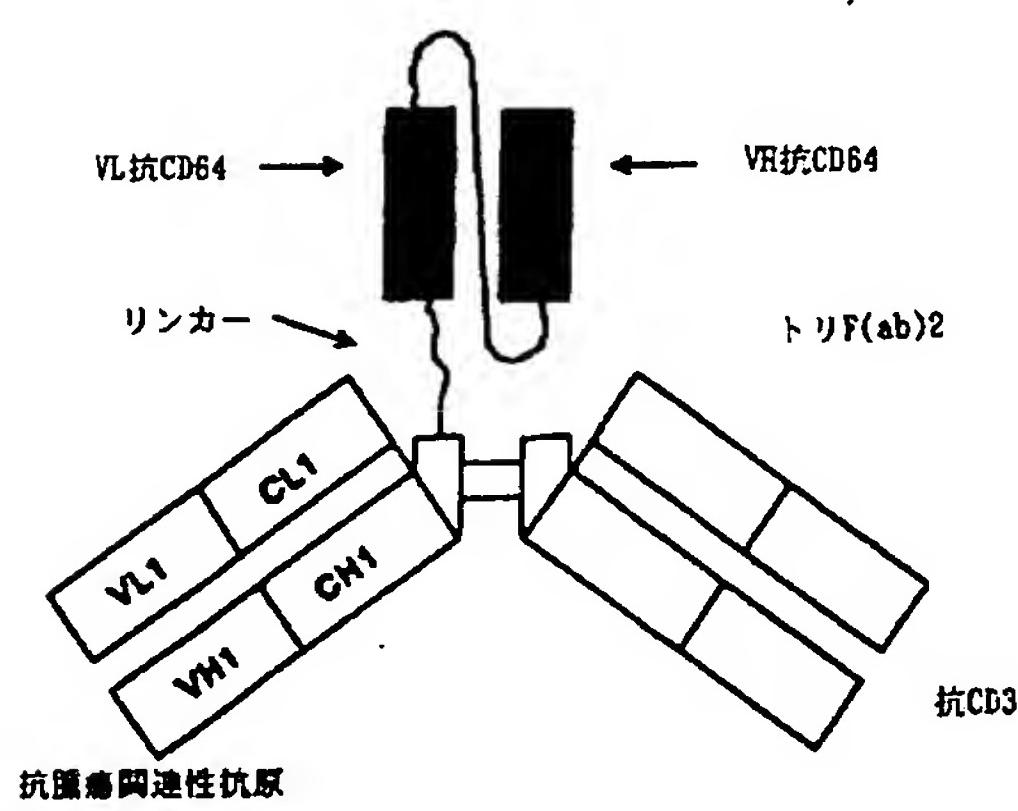


【図4】

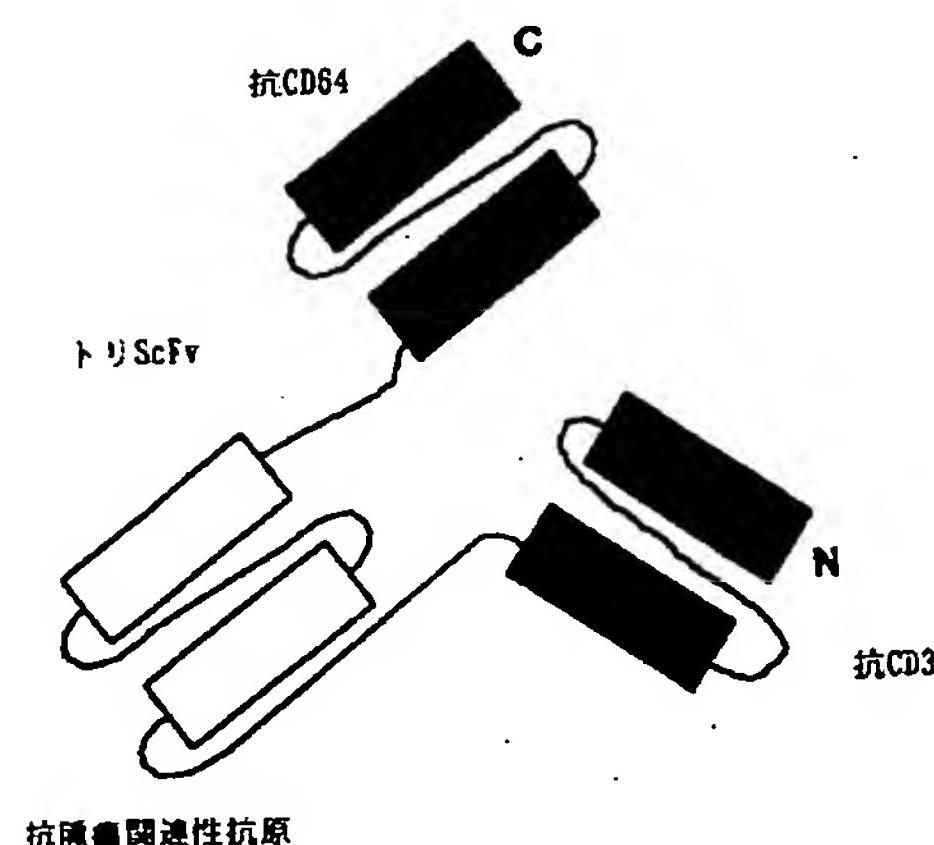
In vivoでの有効性



【図5】



【図6】



フロントページの続き

(72)発明者 ハンス-ヨアヒム・コルブ
ドイツ・D-80804・ミュンヘン・レルヒ
エナウアーシュトラーセ・39

(72)発明者 ラインハルト・ツァイドラー
ドイツ・D-81249・ミュンヘン・ライザ
ウシュトラーセ・12

(72)発明者 ゲオルク・ボルンカム
ドイツ・D-81243・ミュンヘン・オティ
・ロシュトラーセ・6 a